UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES

PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

ANNEE 1971-1972

Série U. N° 499

THESE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE

(Mention Pharmacie)

par

S i m o n e C H A N I O T

Pharmacien

Certificat d'Etudes Spéciales de Sérologie

Certificat de Statistique appliquée à la Biologie Médicale

Chef de Travaux au Laboratoire des Actions de Santé.

1972

ETUDE DE METHODES DE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE L'ASSOCIATION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES

Pénicilline Dihydrostreptomycine Auréomycine

Jury :

Mlle S. LAMBIN	*Président*	
Mr A. DESVIGNES	*Examinateurs*	
Mme J. HUBERT		
Mr R. NETTER	*Examinateurs invités*	
Mr J. DESBORDES		

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES

PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

ANNEE 1971-1972

Série U. N° 499

THESE

présentée

A L'UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE

(Mention Pharmacie)

par

S i m o n e C H A N I O T

Pharmacien

Certificat d'Etudes Spéciales de Sérologie

Certificat de Statistique appliquée à la Biologie Médicale

Chef de Travaux au Laboratoire des Actions de Santé.

ETUDE DE METHODES DE DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE L'ASSOCIATION D'ANTIBIOTIQUES DANS LES PREPARATIONS PHARMACEUTIQUES

Pénicilline Dihydrostreptomycine Auréomycine

Jury :

Mlle S. LAMBIN	*Président*	
Mr A. DESVIGNES	*Examinateurs*	
Mme J. HUBERT		
Mr R. NETTER	*Examinateurs invités*	
Mr J. DESBORDES		

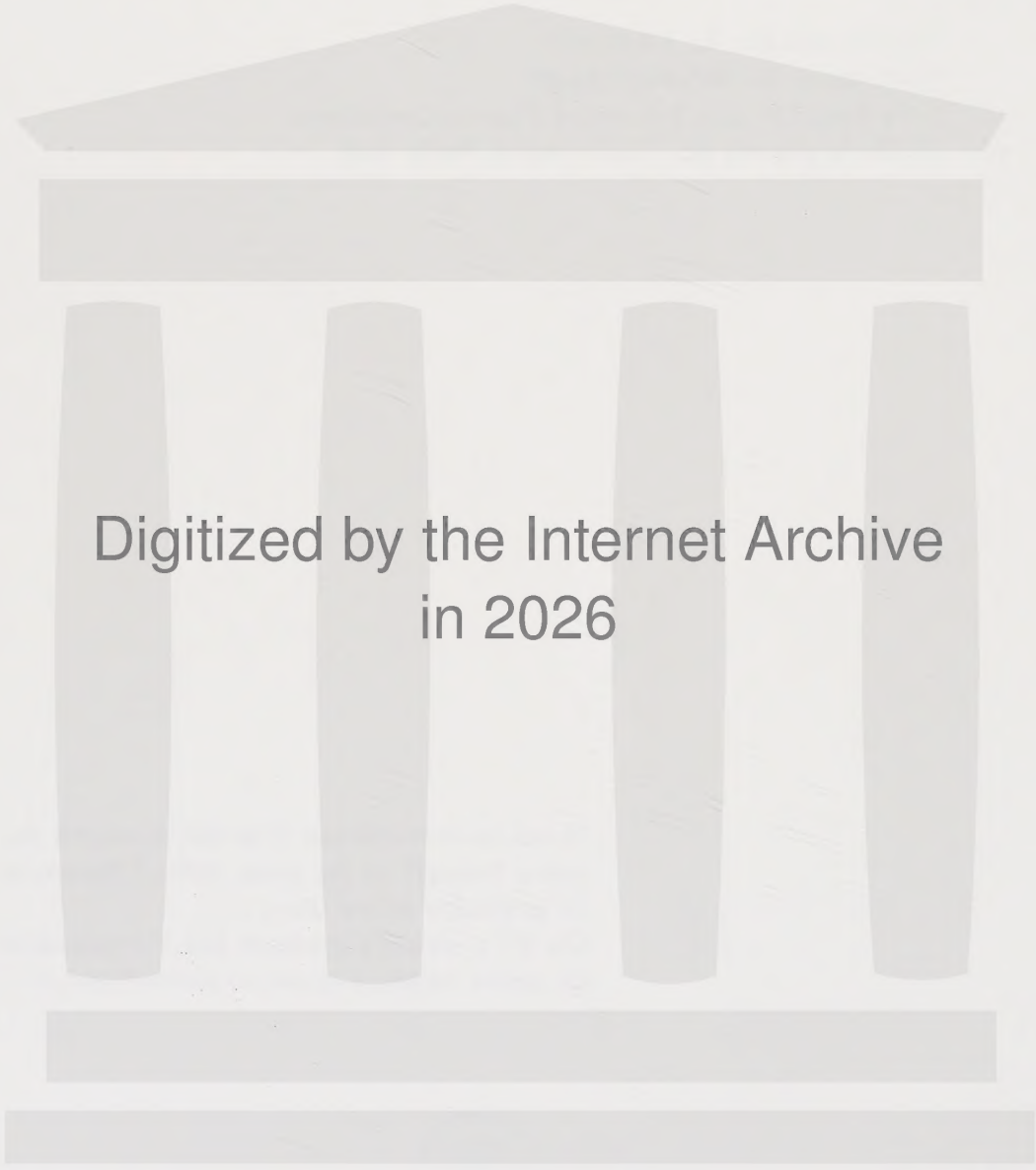
Juin 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A notre Président de Thèse

Mademoiselle S. LAMBIN
Professeur de Microbiologie
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de l'Université Paris-Sud.

Nous la remercions d'avoir accepté de juger
notre travail et de nous faire l'honneur
de présider notre Jury.
Qu'elle veuille trouver ici l'expression
de notre respectueuse reconnaissance.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550019_0024

A Monsieur A. DESVIGNES
Professeur de Cryptogamie
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de l'Université de Paris-Sud.

Nous le remercions de son accueil et de l'attention qu'il a bien voulu nous témoigner en acceptant de juger ce travail.

A Madame J. HUBERT
Maître de Conférence en Bactériologie
à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
et Biologiques de l'Université de Paris-Sud.

Nous lui sommes reconnaissante d'avoir bien voulu s'intéresser à ce travail en acceptant de le juger.

A Monsieur le Docteur R. NETTER
Directeur de Laboratoire
Laboratoire des Actions de Santé.
Section de Virologie.

Qui nous a fait l'honneur de faire
partie du Jury de cette thèse.
En témoignage de notre reconnaissance et
de notre sincère attachement.

A Monsieur J. DESBORDES
Directeur de Laboratoire
Laboratoire des Actions de Santé.
Section de Microbiologie.

Nous le remercions d'avoir accepté
d'être membre de notre Jury.
En témoignage de notre respectueuse
reconnaissance.

A ma Mère

A la mémoire de mon Père

A mon Frère

A tous mes Amis

En témoignage de mon affection.

1 - INTRODUCTION

Depuis la découverte par FLEMING, en 1929, des propriétés antibactériennes du Penicillium notatum, suivie dix ans plus tard de l'extraction de la pénicilline par FLOREY et CHAIN, les recherches se sont poursuivies et ont abouti à l'isolement d'un nombre important de produits à action bactériostatique ou bactéricide sur les germes pathogènes. Un chapitre nouveau de la thérapeutique s'est ainsi créé : l'antibiothérapie.

Celle-ci a rapidement évolué : après l'emploi d'antibiotiques isolés, on a vu apparaître un grand nombre de spécialités pharmaceutiques associant certains antibiotiques entre eux ou antibiotiques et agents chimiothérapiques.

Parallèlement, des méthodes de contrôle, chimiques, physico-chimiques, biologiques et bactériologiques de ces préparations ont été mises au point. C'est ainsi qu'un champ d'investigation s'est ouvert pour le laboratoire d'analyse bactériologique, comprenant d'une part les tests de sensibilité aux antibiotiques, d'autre part le dosage des antibiotiques dans les liquides biologiques et dans les formes pharmaceutiques tant au cours de la fabrication industrielle de celles-ci que dans les produits terminés.

En ce qui concerne les spécialités pharmaceutiques mises à la disposition du thérapeute, il n'est pas besoin de souligner l'intérêt de leur contrôle qui répond au respect des obligations pharmaceutiques en matière de Santé Publique. Il est indispendable, en particulier, de vérifier que les préparations à base d'antibiotiques gardent leurs propriétés antibactériennes intactes, autrement dit un titre constant en antibiotique, dans les limites de leur période d'utilisation.

Le titrage microbiologique présente sur les méthodes chimiques ou physico-chimiques certains avantages : faisant appel à des germes-tests définis, il permet de titrer une activité essentiellement biologique et par là de mettre en évidence une altération éventuelle de l'antibiotique, altération qui peut rester inaperçue ou fausser les dosages chimiques et physico-chimiques. Nous citerons l'exemple bien connu du chloramphénicol dont l'hydrolyse, en solution, fournit une amine primaire et de l'acide dichloracétique (16). D'autre part, certains antibiotiques à structure complexe peuvent donner des réponses différentes selon la proportion de leurs constituants (néomycine, bacitracine, tyrothricine). Enfin le titrage microbiologique se révèle plus sensible que les méthodes chimiques, ce qui permet le dosage de très faibles concentrations d'antibiotiques présents dans certaines préparations pharmaceutiques ou dans les liquides organiques.

Cependant, au passif du titrage microbiologique on peut inscrire les inconvénients suivants : temps assez long pour obtenir une réponse, variant de six à vingt-quatre heures selon les techniques, manipulations également plus longues, matériel plus important et enfin, dans la plupart des cas, moins grande précision que pour les méthodes chimiques et physico-chimiques.

Malgré les inconvénients cités le titrage microbiologique reste la méthode de choix de l'évaluation de l'activité antibiotique d'une préparation pharmaceutique.

De nombreux chercheurs ont mis au point d'excellentes méthodes de titrage et exposé les lois générales concernant les phénomènes biologiques et physiques intervenant au cours de ces dosages (19, 21, 32). Nous ne reviendrons pas sur ces études, mais après un bref résumé des principes généraux des titrages, nous nous intéresserons au titrage des antibiotiques associés dans les préparations pharmaceutiques utilisées en médecine humaine.

Devant l'impossibilité d'envisager tous les titrages d'antibiotiques susceptibles d'être associés entre eux nous nous sommes limités à l'étude du dosage de trois antibiotiques associés dans une pommade répondant à la formule suivante :

Benzylpénicillinate de sodium	500.000 U
Dihydrostreptomycine base (sous forme de sulfate)	0,385 g
Chlorhydrate d'auréomycine	1,00 g
Huile de vaseline	22 g
Paraffine	3 g
Vaseline Q.S.P.	100 g

L'étude de cette association, au cours de laquelle nous nous sommes heurtée à de nombreuses difficultés nous a conduit à envisager les aspects généraux du problème posé par le dosage des associations d'antibiotiques.

II - BASES THEORIQUES DES TITRAGES MICROBIOLOGIQUES

Rappelons brièvement les définitions des deux types de techniques microbiologiques applicables aux dosages des antibiotiques :

Diffusion en gélose :

La méthode par diffusion consiste à étaler, dans des boîtes de Pétri ou sur des plaques de verre, une couche de milieu nutritif gélosé ensemencé avec le germe choisi pour le dosage. Des volumes identiques de solutions antibiotiques étalon et échantillon, en concentrations croissantes, généralement selon une progression géométrique, sont ensuite "déposés" sur la surface de la gélose.

Après 16 à 18 heures d'incubation à l'étuve, à une température déterminée, l'activité inhibitrice de l'antibiotique se traduit par une zone claire circulaire de bactériostase, dont le diamètre, dans la gamme des dilutions utilisées, est proportionnel au logarithme de la concentration antibiotique correspondante.

Turbidimétrie :

Dans une série de tubes à essais stériles on introduit des doses croissantes, subbactériostatiques, généralement selon une progression arithmétique, d'une part d'une solution étalon de titre connu, d'autre part d'une solution à titrer diluée et théoriquement égale à l'étalon. On répartit ensuite dans chaque tube un volume constant de milieu nutritif liquide ensemencé avec un germe-test.

Après 3 à 4 heures d'incubation dans un bain-marie à température convenable - généralement 37°C - l'importance de la croissance microbienne dans chaque tube est mesurée à l'électrophotomètre, la croissance étant d'autant plus faible que la dose d'antibiotique est plus élevée.

Ces méthodes de titrage comportent un certain nombre de variables. Il nous paraît utile de les classer et de déterminer l'importance des causes d'erreur qui leur sont attachées.

Nous sommes en présence, d'une part d'une variable x dite "contrôlée" ou "indépendante" représentée par la gamme des dilutions antibiotiques choisies en vue du titrage, et d'autre part d'une variable y, réponse du germe-test, dite variable "dépendante".

Les sources d'erreur concernant ces deux variables et influençant la précision du résultat sont nombreuses. Nous pouvons les classer en deux types : erreurs dues à l'expérimentateur et au matériel utilisé et erreurs, ou plus exactement variations biologiques, dues au germe-test et au milieu de culture (tableau I).

Tableau I

Variables	Sources de variations intervenant sur x et y
x concentrations antibiotiques	Erreurs du 1er type : - expérimentateur - matériel erreurs systématiques erreurs accidentelles
y réponse : - diamètre des zones d'inhition - opacité des cultures microbiennes en milieu liquide	Erreurs du 1er type + Erreurs du 2ème type - biologiques : 1) germe-test : - sensibilité aux antibiotiques et sensibilité relative vis-à-vis des concentrations choisies. - état du germe et phase de croissance. - taux de l'inoculum. - température et durée d'incubation. 2) milieu nutritif : - composition - pH - concentration et volume de la gélose.

Le paramètre x - concentrations d'antibiotiques - est essentiellement soumis aux erreurs du premier type : erreurs systématiques et accidentelles.

- Les erreurs systématiques, indépendantes du hasard, sont dues au facteur "personnel" de l'expérimentateur et aux instruments utilisés ; elles se produisent généralement dans le même sens (+ ou -).

- Les erreurs accidentelles, par contre, ont lieu dans les deux sens (+ et -).

- Toutes ces erreurs peuvent être très atténuées lorsque l'expérimentateur apporte un soin minutieux à la préparation et à la répartition des dilutions antibiotiques, utilise un appareillage de précision (pipettes et fioles jaugées dites de précision) et veille à la parfaite propreté de la verrerie.

Le paramètre y - réponse du germe-test - outre les erreurs du premier type que nous venons d'envisager, est influencé par des variations nombreuses, plus importantes, de nature aléatoire, dues au matériel biologique : germe-test et milieu nutritif.

Ces variations peuvent également être réduites au maximum. Tout d'abord, et comme il est obligatoire de le faire, en effectuant simultanément le titrage de l'échantillon et de l'étalon, l'activité de l'échantillon étant ainsi jugée par rapport à celle de l'étalon placé dans les mêmes conditions biologiques. En second lieu, en utilisant des milieux nutritifs de composition et de pH bien définis. L'élément le plus susceptible de variation des milieux nutritifs est certainement la ou les peptones utilisées (6, 18). Les milieux en poudre, dits secs, que nous utilisons, présentent des avantages : facilité de préparation, bonne stabilité et composition assez constante pour assurer un développement régulier et logarithmique des germes-tests et contribuer à la reproductibilité des dosages.

Enfin les germes-test seront l'objet de soins attentifs : vérification et ensemencement régulier des souches, préparation de cultures âgées de 18 heures en vue des dosages, standardisation de l'inoculum - suspension en eau distillée, ajustée à un pourcentage déterminé de lumière transmise.

Le dosage microbiologique apparaît donc comme un ensemble d'interactions entre l'antibiotique et le germe-test placé dans un milieu nutritif donné, et toutes les hypothèses concernant les relations entre ces différentes variables doivent être présentes à l'esprit quand on analyse les résultats.

L'examen des résultats est conduit mathématiquement grâce à une analyse de variance, qui consiste à décomposer la variation totale d'un dosage en ses divers éléments, permettant ainsi d'estimer l'importance de chacun d'eux et par suite de s'assurer de la validité du titrage et de ses limites de précision.

III - CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES ANTIBIOTIQUES ASSOCIES

A. Les divers effets des associations. (7, 11, 29, 36, 37, 39)

Les principes des méthodes de dosage des antibiotiques associés sont identiques à ceux qui régissent le dosage des antibiotiques isolés, mais l'action de l'association est souvent différente de celle de chaque antibiotique pris séparément. Les cas suivants peuvent se présenter :

Indifférence :

Cas le plus favorable, chaque antibiotique étant dosé en présence de l'autre, ou des autres, sans que ceux-ci n'apportent de modification.

Interférence : addition, potentialisation d'action ou antagonisme.

- L'addition représente la somme arithmétique des effets antibiotiques. La notion d'effets additifs, délicate à évaluer et variant selon qu'il s'agit de bactériostase ou de bactéricidie, est souvent remplacée par le terme potentialisation d'action.
- La potentialisation d'action est définie comme la capacité des antibiotiques d'augmenter de façon marquée le degré de leur action bactéricide.
- L'antagonisme se traduit par un effet inférieur à celui de l'antibiotique le plus actif.

Soulignons que ces divers modes d'action ne peuvent être pris dans un sens absolu et sont relatifs à la méthode de titrage - diffusion en gélose ou turbidimétrie -, au germe-test choisi et aux propositions respectives des antibiotiques dans l'association.

Le but recherché, pour mener à bien les titrages des antibiotiques associés, est soit de séparer les antibiotiques, soit de les placer dans le cas d'indifférence grâce à une technique appropriée.

Nous présentons les principaux moyens de remédier aux interférences rencontrées dans le tableau II.

B. Moyens de remédier aux interférences :

Tableau II

Méthodes d'élimination des Interférences.	Action spécifique sur chacun des antibiotiques de l'association	Action non spécifique
Physico-chimiques	- séparation par solvants appropriés - inactivation par produits chimiques - pH du diluant et du milieu de dosage	
Biologiques	- inactivation enzymatique - germe-test sensible à l'un des antibiotiques et résistant aux autres. - choix de doses antibiotiques situées au-dessous du seuil de sensibilité de l'antibiotique interférant	- emploi d'une gamme étalon composée des mêmes antibiotiques que ceux associés dans l'échantillon.

C. Bases du choix d'une méthode d'élimination des interférences.

Le choix de telle ou telle méthode d'élimination des interférences repose avant tout sur la connaissance des propriétés physiques et biologiques des antibiotiques : poids moléculaire qui conditionne en grande partie la vitesse de diffusion en gélose, pH d'activité, solubilité dans les principaux solvants, sensibilité aux produits chimiques et aux enzymes et enfin action sur les germes-tests.

Examinons ces principaux points.

1 - Propriétés physiocochimiques :

Les propriétés physico-chimiques des trois antibiotiques associés que nous nous proposons de titrer sont présentées dans les table ux III à VI.

Tableau III

	PM	Solubilités mg/ml (55)						
		eau	Méthanol	Ethanol	Benzène	Toluène	Ether de pétrole	Isooctane
Pénicilline G sodique	356,4	> 20	> 20	10,0	0,047	0,02	0,0	0,032
Auréomycine Chlorhydrate	515,4	8,6	17,4	1,7	0,09	0,03	0,005	0,010
Dihydrostreptomycine sulfate	730,7	> 20	0,35	0,10	0,035	0,05	0,025	0,030

Tableau IV

	Solubilités mg/ml - suite - (55)						
	Acétone	Ether éthylique	1-4 Dioxane	Chloroforme	Pyridine	Formamide	Ethylène glycol
Pénicilline G sodique	0,19	0,06	1,9	0,05	1,15	> 20	> 20
Auréomycine Chlorhydrate	0,12	0,085	1,45	0,02	> 20	5,9	3,0
Dihydrostreptomycine sulfate	0,01	0,24	0,430	0,022	0,50	0,50	0,04

Tableau V

	Action des solutions acides et alcalines	Action des oxydants et des réducteurs	Action des cations métalliques	Action de la chaleur
Pénicilline G sodique	inactivation rapide à pH $\leq$ 6 et pH $\geq$ 7	inactivée par MnO_4K, peroxydes, cystéine, $NaBH_4$.	non complexée par la plupart des cations métalliques.	inactivation rapide avec l'élévation de température.
Auréomycine chlorhydrate	activité conservée entre pH 2 et 6, diminuée pour pH $\geq$ 7.	dénaturée par certains oxydants. inactivée par $NaBH_4$.	formation de complexes avec certains cations (Fe, Al, Co, Cu, Mg).	inactivée par chauffage à 100° pendant 30 minutes.
Dihydrostreptomycine sulfate	diminution d'activité à pH $<$ 7	activité diminuée par H_2O_2, KI, MnO_4K. non inactivée par $NaBH_4$.	formation de complexes avec certains cations (Mg, Ca, Cu, Ni, Co).	stable en solution au-dessous de 25°C.

Tableau VI

	Charge électrique en solution	pH optimum d'activité	Action destructrice de la pénicillinase.
Pénicilline G sodique	anion	6	+
Auréomycine chlorhydrate	anion	5 à 6	-
Dihydrostreptomycine sulfate	cation	8	-

La comparaison des propriétés physico-chimiques des trois antibiotiques ne nous permet pas d'établir d'emblée une méthode de titrage microbiologique. Nous verrons cependant ultérieurement ce qu'elles peuvent nous apporter.

2 - Propriétés biologiques des antibiotiques.

La méthode de titrage repose avant tout sur le choix des germes-tests sensibles à l'antibiotique que l'on se propose de titrer et autant que possible insensibles ou peu sensibles aux antibiotiques associés.

Il nous a semblé qu'une rapide revue des connaissances que nous possédons sur le site d'action des antibiotiques sur les bactéries s'inscrivait dans le cadre de notre travail.

Mode d'action des antibiotiques sur les bactéries : (17,24, 34, 35, 51, 52)

a) Action sur la paroi bactérienne :

La structure de base de la paroi des bactéries est un mucopolysaccharide formé de chaînes de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique, sur lesquels sont fixés des pentapeptides. Les chaînes sont reliées entre elles, au niveau des pentapeptides par des pentaglycines, l'ensemble formant ainsi un réseau.

Certains antibiotiques, dont la pénicilline, perturbent la biosynthèse de la paroi par plusieurs mécanismes dont l'un consiste à inhiber la réaction de transpeptidation responsable de la liaison des chaînes latérales entre elles. L'altération de la paroi aboutit à des bactéries fragiles, osmosensibles, facilement lysées en milieu hypotonique.

Les bactéries à gram négatif, ayant une paroi formée seulement de 10 % de mucopolysaccharides, apparaissent par contre beaucoup plus résistantes.

Ce mode d'action explique que la pénicilline par exemple, n'ait d'action bactéricide que sur les germes en voie de multiplication, leur action étant diminuée et parfois même inhibée par les antibiotiques à action bactériostatique.

b) Action sur la membrane cytoplasmique :

La membrane cytoplasmique, située sous la paroi bactérienne, est formée de 60 % de protéines et de 40 % de phospholipides. Elle représente une barrière osmotique semi-perméable.

Certains antibiotiques, dont la plupart des oligosaccharides (streptomycine), des polypeptides cycliques (polymyxine B) agissent de diverses manières sur la membrane, soit par contact direct à la façon des détergents cationiques (antibiotiques polypeptidiques), soit en inhibant sa synthèse (oligosaccharides).

Ces antibiotiques présentent une action bactéricide sur les germes au repos ou en voie de développement et potentialisent les antibiotiques bactériostatiques.

c) Action sur la synthèse des acides nucléiques et des protéines :

- Antibiotiques inhibant les synthèses nucléiques (ADN et ARN) :

C'est le cas de l'actinomycine D, qui inactive les molécules d'ADN

- Antibiotiques dont l'action principale consiste en une inhibition des synthèses protéiques :

La synthèse protéique nécessite l'intervention des acides nucléiques. L'ARNm (ARN messager) porteur du code génétique transmis par l'ADN, se développe dans le cytoplasme ; les ribosomes se fixent, par leur fraction 30 S sur l'ARNm et le parcourent d'un bout à l'autre en donnant naissance à une molécule protéique. Pour être incorporés dans la molécule protéique, les

acides aminés doivent être transportés et activés, ce qui est effectué par les ARNt (ARN de transfert) au niveau de la fraction 50 S des ribosomes.

De nombreux antibiotiques perturbent la synthèse protéique : le groupe des oligosaccharides auquel appartient la streptomycine, les tétracyclines, le chloramphénicol et les macrolides (érythromycine, spiramycine).

La streptomycine, en se fixant sur la fraction 30 S des ribosomes, provoque des altérations de la lecture du code génétique de l'ARNm par les ribosomes. Les erreurs ainsi commises conduisent à des molécules protéiques anormales et inutilisables par la bactérie par suite du remplacement d'un amino-acide par un autre.

Les tétracyclines, en se fixant sur la fraction 50 S des ribosomes, empêchent les complexes ARNt-acides aminés de se fixer sur les ribosomes. Les acides aminés ne pouvant plus être incorporés dans les polypeptides en cours de formation restent dans le cytoplasme.

Les antibiotiques agissant sur les acides nucléiques et la synthèse des protéines bactériennes provoquent une inhibition de la croissance des bactéries, donc un effet bactériostatique. Ces antibiotiques sont souvent synergiques entre eux.

La connaissance des mécanismes d'action des antibiotiques sur les bactéries peut permettre d'expliquer pourquoi lors d'associations d'antibiotiques, on assiste parfois à une potentialisation (cas de l'association d'un bactéricide par action sur la paroi bactérienne avec un bactéricide par action sur la membrane cytoplasmique), soit à une addition (cas de l'action de deux bactériostatiques), soit à un antagonisme (cas de l'association d'un bactériostatique avec un bactéricide sur les germes en voie de développement, lorsque l'antibiotique qui inhibe la croissance du germe agit plus rapidement que celui qui tue le germe).

La synergie pénicilline-streptomycine sur les germes sensibles à ces deux antibiotiques est bien connue (43).

Dans l'association pénicilline-auréomycine, l'auréomycine tend à provoquer une diminution de l'activité antibactérienne de la pénicilline. SELIGMAN a étudié cette action sur Escherichia coli (49). Cependant d'autres auteurs, tel PAREDES (40), ont décrit l'action synergique de la pénicilline et de la tétracycline sur 30 souches de staphylocoques pathogènes et ont noté que la plus forte synergie était obtenue avec les staphylocoques sensibles à de faibles concentrations de tétracycline.

Les cas de synergie streptomycine-tétracyclines s'appliquent principalement à un certain nombre d'entérobactéries et au genre Brucella.

En fait, si les modes d'action essentiels des antibiotiques sur les bactéries sont actuellement connus, il n'en reste pas moins que beaucoup d'obscurités subsistent quant au mécanisme intime des inhibitions.

IV - EXPERIENCES PRELIMINAIRES AUX TITRAGES DES ANTIBIOTIQUES ASSOCIES

Avant d'exposer nos expériences préliminaires nous désirons fournir quelques précisions sur les étalons antibiotiques et les souches microbiennes que nous avons utilisés au cours de ces expériences et des titrages définitifs.

Etalons antibiotiques :

Il s'agit d'étalons de travail titrés par rapport aux étalons internationaux.

- Benzylpénicillinate de sodium, titre : 1660 U/mg
- Dihydrostreptomycine sulfate, titre : 768 mcg/mg, exprimé en mcg de dihydrostreptomycine base par mg de sulfate.
- Auréomycine chlorhydrate, titre : 1000 mcg/mg.

Ces étalons sont conservés à + 4°C, en ampoules scellées, renfermant chacune environ 100 mg de produit.

Souches microbiennes :

Les souches microbiennes que nous utilisons couramment pour les titrages de la pénicilline, de la dihydrostreptomycine et de l'auréomycine sont les suivantes. Nous indiquons pour chacune d'elles la technique usuelle.

- Staphylococcus aureus ATCC 6538 P :
  1 - diffusion en gélose (pénicilline)
  2 - turbidimétrie (auréomycine)
- Staphylococcus aureus 101 :
  turbidimétrie (pénicilline)
- Bacillus subtilis ATCC 6633 :
  diffusion en gélose (dihydrostreptomycine)
- Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 :
  turbidimétrie (dihydrostreptomycine et auréomycine)

Nous avons en outre dans notre laboratoire deux souches microbiennes que nous devons à l'obligeance des services de Monsieur Y. CHABBERT, Institut Pasteur. Ces souches, entretenues régulièrement depuis sept ans n'ont jamais présenté de modifications.

- Staphylococcus IP 52150 : sensible aux tétracyclines et résistant à la streptomycine, avec lequel nous avons mis au point un dosage par turbidimétrie de l'auréomycine.
- Staphylococcus "Delarue" : sensible à la streptomycine et résistant aux tétracyclines, avec lequel nous avons également mis au point une méthode de titrage par diffusion en gélose de la dihydrostreptomycine.

Tous ces germes sont entretenus par ensemencement sur géloses inclinées tous les mois et conservés à + 4°C.

A - Détermination des seuils de sensibilité et d'interférence des antibiotiques.

Suivant l'exemple donné par ARRET (2, 3), nous avons établi les seuils de sensibilité et les seuils d'interférence des trois antibiotiques que nous nous proposons de titrer, en utilisant nos techniques de dosage habituelles. Celles-ci sont décrites dans la partie "Annexe" de notre travail.

Seuils de sensibilité :

Nous appelons A l'antibiotique à titrer selon sa méthode usuelle, B et C les deux autres antibiotiques qui lui sont associés. Utilisant successivement les techniques de titrage précédemment citées pour le titrage de A, nous avons recherché les concentrations minimales de B et C qui, dans les mêmes conditions, donnaient une réponse juste mesurable (zone d'inhibition ou opacité microbienne).

Seuils d'interférence :

Envisageant également chaque technique séparément nous avons pris l'antibiotique A faisant l'objet du dosage à sa dilution référence : point médian de la gamme de titrage. Nous l'avons associé aux deux autres antibiotiques suivant le schéma : A + B, A + C, A + B + C, la dilution référence A étant associée à des dilutions croissantes de B et C, toutes les dilutions ayant été effectuées dans le solvant utilisé pour le dosage de A.

Nous exposons les résultats dans les tableaux suivants.

- Tableau VII, page 23 : Seuils de sensibilité
- Tableau VIII à X, pages 24 et 25 : Seuils d'interférence.

Tableau VII

Seuils de sensibilité.

Concentrations des antibiotiques isolés, donnant une réponse juste mesurable dans chacune des techniques de titrage.

		Pénicilline U/ml	Auréomycine mcg/ml	D.H.S mcg/ml (*)
Techniques de titrage de la pénicilline	Diffusion en gélose S. aureus ATCC 6538 P	0,1	0,2	40
	Turbidimétrie S. aureus 101	0,005	0,005	>10
Techniques de titrage de la Dihydro streptomycine	Diffusion en gélose B. subtilis ATCC 10 031	0,1	3	0,5
	Turbidimétrie K. pneum. ATCC 10 031	>10	0,005	0,2
	Diffusion en gélose Staphylo. "Delarue"	100	500	1,5
Techniques de titrage de l'Auréomycine	Turbidimétrie K. pneum. ATCC 10 031	>10	0,004	0,4
	Turbidimétrie S. aureus ATCC 6538 P	0,005	<0,001	0,5
	Turbidimétrie Staphylo. I.P. 52 150	0,05	<0,006	>100

* Dihydrostreptomycine : concentrations exprimées en mcg de base par ml.

Les concentrations antibiotiques figurant dans chaque case représentent :

1 - Pour les techniques de diffusion en gélose : les concentrations des solutions servant à imprégner les disques de papier-filtre.

2 Pour les techniques par turbidimétrie : les concentrations finales dans les tubes à essais.

Tableaux VIII à X - Seuils d'interférence

Concentrations des antibiotiques B et C provoquant une interférence juste mesurable lorsqu'ils sont associés à la concentration référence de l'antibiotique A et testés selon la technique de titrage de A.

Tableau VIII

Techniques de Titrage de la Pénicilline.

		Pénicilline	
	+ Auréo. (*) mcg/ml	+ DHS (**) mcg/ml	+ Auréo. et DHS mcg/ml
Pénicilline : 1 U/ml Diffusion en gélose Staphylo. ATCC 6538 P	0,2	40	0,2 (Auréo.) 40 (DHS)
Pénicilline : 0,02 U/ml Turbidimétrie Staphylo. 101	0,005	> 10	0,005 (Auréo.) >10 (DHS)

* Auréomycine chl. * * Dihydrostreptomycine base

Tableau IX

Techniques de Titrage de la Dihydrostreptomycine

	Dihydrostreptomycine		
	+ Péni. (*) U/ml	+ Auréo. (**) mcg/ml	+ Péni. et Auréo. U/ml et mcg/ml
Dihydrostreptomycine : 2 mcg/ml Diffusion en gélose Bacillus subtilis ATCC 6633	0,5	5	0,5 (Péni.)
Dihydrostreptomycine : 1 mcg/ml Turbidimétrie Klebsiella pneum. ATCC 10031	>10	0,005	>10 (Péni.) 0,005 (Auréo.)
Dihydrostreptomycine : 10 mcg/ml Diffusion en gélose Staphylo. "Delarue"	100	500	100 (Péni.) 500 (Auréo.)

* Pénicilline G sodique * * Auréomycine chl.

Tableau X

Techniques de titrage de l'Auréomycine

	Auréomycine		
	+ Péni. (*) U/ml	+ DHS (**) mcg/ml	+ Péni. et DHS U/ml et mcg/ml
Auréomycine : 0,02 mcg/ml Turbidimétrie Klebsiella pneum. ATCC 10031	>10	0,01	>10 (Péni.) 0,01 (DHS)
Auréomycine : 0,006 mcg/ml Turbidimétrie Staphylo. ATCC 6538 P	0,005	0,5	0,005 (Péni.) 0,5 (DHS)
Auréomycine : 0,01 mcg/ml Turbidimétrie Staphylo. IP 52150	< 0,005	>100	<0,005 (Péni.) > 100 (DHS)

* Pénicilline G sodique

** Dihydrostreptomycine base.

Comme précédemment, les concentrations des antibiotiques figurant dans chaque case représentent :

1 - Pour les techniques de diffusion en gélose : les concentrations utilisées pour imprégner les disques de papier-filtre.

2 - Pour les techniques par turbidimétrie : les concentrations finales dans les tubes à essais.

Interprétation des seuils de sensibilité et d'interférence :

Avant d'envisager les possibilités de réaliser les titrages selon les méthodes habituelles, compte tenu des résultats obtenus, nous rappelons les concentrations respectives des antibiotiques contenus dans le produit que nous avons à titrer, afin d'établir plus facilement les comparaisons avec les rapports des seuils d'interférence.

Pénicilline/Auréomycine	: 0,5 U/1 mcg
Dihydrostreptomycine/Pénicilline	: 0,77 mcg/1 U
Dihydrostreptomycine/Auréomycine	: 0,385 mcg/1 U

I - Techniques de titrage de la Pénicilline :

a) Diffusion en gélose avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P :

Le seuil de sensibilité de la dihydrostreptomycine est assez élevé : 40 mcg/ml. Ceci est probablement dû, en partie, au fait que l'antibiotique n'est pas à son pH optimum de diffusion, le pH de la gélose étant égal à 6,6. La dihydrostreptomycine ne gêne donc pas le dosage de la pénicilline.

Par contre l'auréomycine agit sur le staphylocoque déjà à la concentration de 0,2 mcg/ml. A cette dose et aux concentrations supérieures testées, elle donne des zones d'inhibition aux bords peu nets, formés de microcolonies qui subissent l'action bactériostatique de l'auréomycine. Associée à la pénicilline elle provoque un phénomène de double zone d'inhibition dû aux vitesses de diffusion différentes des deux antibiotiques ; les limites de ces doubles zones manquent de netteté. La lecture est difficile, imprécise.

Le dosage de la pénicilline en présence d'auréomycine est donc impossible par cette méthode et nécessite la recherche d'un inhibiteur de l'auréomycine.

b) Turbidimétrie avec Staphylococcus aureus 101 :

Nous retrouvons les mêmes effets que lors de la diffusion en gélose : la dihydrostreptomycine ne gêne pas le dosage de la pénicilline alors que l'auréomycine a une action fortement inhibitrice sur le germe-test. Le titrage de la pénicilline est irréalisable par cette méthode.

2 - Techniques de titrage de la dihydrostreptomycine :

a) Diffusion en gélose avec Bacillus subtilis ATCC 6633 :

Ce germe-test se révèle assez sensible à la pénicilline (0,1 U/ml) et présente une certaine sensibilité à l'auréomycine (3 mcg/ml), bien que le pH de la gélose (pH 8) ne soit pas particulièrement favorable à l'action de ces deux antibiotiques. Nous avons noté que la dihydrostreptomycine et la pénicilline donnaient des zones d'inhibition très nettes dans cette gélose, tandis que celles de l'auréomycine étaient peu nettes.

Le rapport des concentrations des seuils d'interférence dihydrostreptomycine/pénicilline étant 2 mcg/0,5 U, la pénicilline gênera le dosage de la dihydrostreptomycine ; la pénicilline devra être éliminée.

Le rapport des concentrations de la dihydrostreptomycine et de l'auréomycine dans la formule de notre produit (0,385 mcg/1 mcg) est voisin de celui qui détermine un début d'interférence (2 mcg/5 mcg). Nous en tiendrons compte lors de la réalisation du dosage.

b) Turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 :

Ce Klebsiella se montre peu sensible à la pénicilline mais par contre plus sensible à l'auréomycine que la dihydrostreptomycine elle-même, sans que l'on note de synergie entre ces deux antibiotiques. Le dosage de la dihydrostreptomycine en présence d'auréomycine se révèle impossible par cette technique.

c) Diffusion avec Staphylococcus "Delarue" :

Ce germe, très résistant à l'auréomycine et à la pénicilline, permet un dosage facile de la dihydrostreptomycine qui donne des zones d'inhibition parfaitement délimitées.

3 - Techniques de titrage de l'auréomycine :

a) Turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031.

Comme nous l'avons déjà indiqué ce Klebsiella se montre plus sensible à l'auréomycine qu'à la dihydrostreptomycine. Les seuils de sensibilité à peine différents obtenus dans la technique de titrage de l'auréomycine sont dûs probablement au taux d'inoculum un peu plus élevé.

Nous notons que le rapport des concentrations auréomycine/dihydrostreptomycine (1 mcg/0,385 mcg) du produit à titrer est un peu inférieur, mais proche de celui du seuil d'interférence (0,02 mcg/0,01 mcg).

L'interférence de la pénicilline n'est pas à redouter dans cette technique.

b) Turbidimétrie avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

La dihydrostreptomycine présente une certaine activité sur ce staphylocoque dans la méthode par turbidimétrie, mais elle ne doit pas interférer.

Par contre la pénicilline possède une action notable (seuil de sensibilité : 0,005 U/ml). Cependant le rapport des concentrations pénicilline/auréomycine dans le produit à titrer (0,5 U/ 1 mcg) étant inférieur à celui des seuils d'interférence (0,005 U/0,006 mcg) la pénicilline ne devrait pas gêner le dosage de l'auréomycine.

c) Turbidimétrie avec Staphylococcus I.P 52150 :

Ce germe se montre très résistant à la dihydrostreptomycine et permet un dosage aisé de l'auréomycine. Par contre, la pénicilline, très active, devra être éliminée de l'association.

En résumé l'étude des résultats des seuils d'interférence permet les conclusions suivantes en ce qui concerne le dosage de chacun des antibiotiques dans l'association.

Dosage de la pénicilline :

Les dosages ne sont pas réalisables par les deux techniques indiquées. Nous devrons chercher une méthode destinée à supprimer l'action de l'auréomycine.

Dosage de la dihydrostreptomycine :

- Diffusion en gélose avec B. subtilis ATCC 6633 :

La pénicilline devra être inhibée par la pénicillinase. L'auréomycine présente le risque de provoquer un début d'interférence. Dans ce cas la méthode la plus simple consisterait à titrer l'échantillon par rapport à un étalon dihydrostreptomycine - auréomycine associées, le rapport des concentrations étant le même que celui du produit à titrer. Bien que l'emploi d'un étalon ainsi "compensé" soit recommandé par un certain nombre d'auteurs (25, 32) il semble préférable d'utiliser un étalon formé d'un seul antibiotique, permettant d'estimer une activité biologique à l'état pur.

- Turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 :

Le dosage est impossible par cette technique. Il sera nécessaire de chercher une méthode pour inhiber ou séparer l'auréomycine qui interfère.

- Diffusion en gélose avec Staphylococcus "Delarue" :

Le dosage est parfaitement réalisable.

Dosage de l'auréomycine :

- Turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 :

Etant donné le risque d'interférence de la part de la dihydrostreptomycine, il serait possible de réaliser le titrage par comparaison avec un étalon auréomycine - dihydrostreptomycine associées. Nous apportons toutefois les mêmes réserves que celles formulées à propos du titrage de la dihydrostreptomycine avec B. subtilis.

- Turbidimétrie avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P :

Le dosage semble possible. La dihydrostreptomycine ne crée pas d'interférence. La pénicilline ne semble pas interférer mais une excellente précaution consiste à l'inhiber par la pénicillinase.

- Turbidimétrie avec Staphylococcus I.P 52150 :

Le dosage sera réalisé après inhibition de la pénicilline pas la pénicillinase.

B - Recherche d'un procédé physico-chimique de séparation ou d'inhibition de l'un des antibiotiques.

Examinons à présent les différents moyens de séparer les trois antibiotiques ou d'inhiber leur action spécifique par un procédé physico-chimique.

Tous nos essais ont été effectués à partir d'un échantillon stock préparé avec les antibiotiques étalons intimement mélangés, reproduisant les proportions de la formule du produit triantibiotique.

1) Essais de séparation par solvants sélectifs :

En nous reportant à une méthode précédemment décrite par GROVE et RANDALL (25) concernant des préparations pharmaceutiques de composition voisine, nous avons effectué l'expérience suivante :

La prise d'essai des antibiotiques (35,5 mg, correspondant à la formule de 2 g de pommade) est déposée sur verre fritté - tube d'Allihn - porosité n° 4, et lavée à quatre reprises avec chaque fois 10 ml d'acétone contenant 0,3 % de pipéridine qui solubilise l'auréomycine seule.

Les filtrats sont recueillis dans une fiole jaugée de 100 ml et l'on complète au trait de jauge avec du tampon phosphaté pH 6. Cette solution, titrant 200 mcg/ml, est diluée pour obtenir 0,04 - 0,06 - 0,08 mcg/ml en vue de réaliser le titrage de l'auréomycine par turbidimétrie avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P.

Les antibiotiques restant sur le filtre, pénicilline et dihydrostreptomycine, sont dissous par lavage avec de l'eau distillée stérile et les filtrats recueillis dans une fiole jaugée de 100 ml. Nous avons une solution titrant théoriquement 100 U/ml de pénicilline et 77 mcg/ml de dihydrostreptomycine.

A partir de cette solution, des dilutions sont opérées, d'une part en vue du dosage de la pénicilline par diffusion en gélose avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, d'autre part en vue du titrage de la dihydrostreptomycine par turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031.

Trois essais ont été effectués et ont donné les résultats moyens suivants :

- Dosage de l'auréomycine : perte de 5 à 10 %, due probablement à une solubilisation incomplète de l'antibiotique et à une adsorption sur le filtre.
- Dosage de la pénicilline : perte de 6 à 8 %, due sans doute à une légère solubilité dans l'acétone pipéridine.
- Dosage de la dihydrostreptomycine : les écarts trouvés, ± 3 % environ, sont négligeables et rentrent dans le cadre de la variabilité des dosages microbiologiques.

Nous n'avons pu utiliser les autres solvants en vue d'une séparation de ces trois antibiotiques, les solubilités ou insolubilités de ceux-ci dans les solvants organiques étant très voisines (tableaux III et IV).

En conclusion, la méthode de séparation des antibiotiques présentée nous conduit à la retenir en vue du dosage de la dihydrostreptomycine seule, les déficits subis par la pénicilline et l'auréomycine étant trop importants pour permettre leur titrage.

2) Essais des inhibiteurs chimiques.

L'emploi d'inhibiteurs chimiques spécifiques s'avère difficile dans le cas des trois antibiotiques étudiés. Ils se dégradent facilement sous l'action des acides, des bases, et de certains oxydants ou réducteurs.

Nos recherches nous ont conduit à essayer l'action de deux catégories de produits chimiques sur chacun des trois antibiotiques :

- un réducteur : le borohydrure de sodium
- les sels métalliques.

1 - Action du borohydrure de sodium

KAPLAN et coll. (31) ont indiqué l'emploi du borohydrure de sodium pour le titrage de la kanamycine en présence de tétracycline.

Nous avons donc essayé ce produit dans le cas de notre association en vue du dosage de la dihydrostreptomycine et effectué les essais suivants, à l'aide d'une solution de borohydrure de sodium (BH_4Na. Merck) à 5 mg/ml en eau distillée.

- Antibiotiques associés :

L'échantillon (10 000 mcg d'auréomycine chlorhydrate, 5 000 U de pénicilline G sodique et 3 850 mcg de dihydrostreptomycine base) est placé dans une fiole de 100 ml et dissout avec environ 50 ml d'eau distillée stérile.

On ajoute 4 ml de solution de BH_4Na et l'on complète à 100 ml avec l'eau distillée.

La solution est laissée pendant 1 heure à la température ordinaire, en agitant toutes les 15 minutes environ.

- Témoins antibiotiques, avec et sans BH_4Na :

  Simultanément on prépare les solutions :

  - antibiotiques associés sans BH_4Na
  - solutions des trois antibiotiques isolés, avec et sans BH_4Na

- L'essai est effectué par diffusion en gélose avec Bacillus subtilis ATCC 6633, dans les conditions du dosage de la dihydrostreptomycine ; les solutions sont diluées en tampon pH 8 pour obtenir 1 - 2 - 4 mcg/ml de dihydrostreptomycine base ; ces solutions contiennent également en théorie : 1,3 - 2,6 - 5,2 U/ml de pénicilline et 2,6 - 5,2 - 10,4 mcg/ml d'auréomycine environ.

- Les résultats montrent que l'auréomycine est inhibée totalement à la dose de 100 mcg/ml.

  La pénicilline est inhibée partiellement : seules les concentrations 5,2 U/ml donnent de petites zones d'inhibition avec la solution contenant BH_4Na. Les zones d'inhibition des antibiotiques associés sont comparables à celles de la dihydrostreptomycine, (solutions de dihydrostreptomycine traitées et non traitées par BH_4Na).

  Il apparait donc que l'emploi du borohydrure de sodium permet d'effectuer le titrage de la dihydrostreptomycine associée à l'auréomycine et à la pénicilline dans le cas qui nous préoccupe.

2 - Action des sels métalliques

De nombreuses observations ont été publiées (9, 28, 33, 45, 46, 57 à 62) concernant l'action de cations métalliques variés sur les antibiotiques (Fe^{+++}, Al^{+++}, Mg^{++}, Mn^{++}, Ca^{++}....)

Ces cations ont pour effet de déprimer l'action inhibitrice de certains antibiotiques sur les bactéries sensibles. Leur action in vitro dépend de la nature de l'antibiotique et de celle du cation, de leurs concentrations respectives, des bactéries testées et de la composition du milieu

Selon PRICE et coll. (44) le degré d'inhibition d'un antibiotique par les cations métalliques est le plus souvent fonction de son caractère basique : la dihydrostreptomycine est donc inhibée par ces cations, tandis que la pénicilline, molécule acide, ne subit aucune action.

Cette inhibition est expliquée également par l'aptitude de la molécule antibiotique à former des complexes avec les ions métalliques. WEINBERG (58 à 61) et d'autres auteurs (4, 5, 30) ont étudié ces com-complexes, en particulier pour les tétracyclines.

Cependant la suppression de l'effet inhibiteur des antibiotiques par certains cations est en relation étroite avec les diverses espèces bactériennes et peut varier au sein d'une même famille de bactéries. Nous reproduisons, à titre d'exemple, une partie des résultats de WEINBERG (58) concernant l'action de certains cations métalliques sur l'activité inhibitrice de la tétracycline vis-à-vis de quelques bactéries.

Genres	Cations actifs				
	Fe^{++}	Mg^{++}	Mn^{++}	Ca^{++}	Al^{+++}
Bactéries gram négatif					
Pseudomonas	++	++	+	-	-
Escherichia	++	++	-	-	-
Proteus	++	++	-	-	-
Azotobacter	++	-	-	-	-
Bactéries gram positif					
Bacillus	++	++	-	-	-
Lactobacillus	++	-	-	-	-
Streptococcus	++	-	-	-	-
Micrococcus	+	++	-	++ (*)	-

++ : cations possèdant une forte action
+ : cations possèdant une action modérée
- : cations sans action.
(*) : Ca^{++} ne s'est révelé actif que sur une, parmi les 4 souches de Staphylocoques testés.

L'étude de l'action des cations métalliques sur les antibiotiques nous a ainsi conduit à envisager la possibilité d'une application au dosage de la pénicilline en présence de dihydrostreptomycine et d'auréomycine.

Nous avons recherché l'action des cations Mg^{++} et Ca^{++} sur les trois antibiotiques en utilisant les techniques de titrage de la pénicilline : diffusion en gélose avec Micrococcus aureus ATCC 6538 P et turbidimétrie avec Staphylococcus aureus 101.

1) Essais par diffusion en gélose avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

a) Action du cation Mg^{++} : recherche d'une concentration inhibitrice.

- Solution de sulfate de magnésium :

Nous avons préparé une solution de sulfate de magnésium 2 M en eau distillée ($MgSO_4, 7H_2O$ - PM : 246, 48), stérilisée ensuite par filtration sur membrane Millipore.

A partir de cette solution nous avons effectué des dilutions en eau distillée stérile : M - 0,1 M - 0,01 M et 0,001 M.

- Incorporation des solutions à la gélose :

Cinq flacons de gélose fondue Difco 2 (gélose de fond) ont reçu les solutions de sulfate de magnésium 2 M à 0,001 M, à raison de 5 ml pour 100 ml de gélose.

La même opération a été effectuée avec la gélose Difco 1 de surface, ensemencée en masse au préalable avec le staphylocoque puis répartie dans cinq flacons. Chaque flacon a reçu 5 ml de solution de sulfate de magnésium pour 100 ml de gélose. Les boîtes de Pétri ont été préparées selon la technique habituelle : 21 ml gélose de fond et 4 ml de gélose ensemencée en surface.

- Boîtes de Pétri témoins :

Il s'agit des mêmes géloses sans sulfate de magnésium mais recevant 5 ml d'eau distillée stérile pour 100 ml de gélose, afin de conserver la même concentration en gélose dans les deux séries.

- Antibiotiques :

Les solutions antibiotiques ont été préparées à l'aide du tampon pH 6 utilisé dans la technique de titrage de la pénicilline :

pénicilline	: 0,5 à 5 U/ml
auréomycine	: 0,5 à 20 mcg/ml
dihydrostreptomycine	: 30 - 40 - 50 mcg/ml
antibiotiques associés	: le rapport des concentrations étant le même que celui du produit à titrer.

- Examen des résultats :

Le germe-test présentait une croissance normale sur les boîtes de Pétri contenant du sulfate de magnésium, comparable à celle des boîtes témoins

Pénicilline : sur toutes les boîtes contenant du sulfate de magnésium la pénicilline donnait des zones d'inhibition normales dont le diamètre moyen était identique à celui des boîtes témoins.

Auréomycine :

boîtes témoins : nous avons obtenu des zones d'inhibition pour toutes les doses testées, zones aux limites imprécises ainsi que nous l'avons déjà signalé.

boîtes avec sulfate de magnésium : sur les géloses ayant reçu les solutions $MgSO_4$ 0,001 M et 0,01 M nous n'avons pas trouvé d'inhibition perceptible de l'auréomycine. La solution $MgSO_4$ 0,1 M produisait une légère réduction des zones d'inhibition, difficile à évaluer étant donné l'imprécision des limites de ces zones.

Sur les boîtes de gélose ayant reçu la solution $MgSO_4$ M, l'inhibition intervenait pour la concentration 2 mcg/ml et en deça, la concentration 4 mcg/ml donnant un début de zone d'inhibition.

Avec la solution $MgSO_4$ 2 M, les concentrations 0,5 à 2 mcg/ml d'auréomycine ne donnaient aucune zone d'inhibition, tandis qu'à 4 mcg/ml on trouvait régulièrement une légère auréole formée de microcolonies mais ne représentant pas une zone d'inhibition vierge de germes.

Dihydrostreptomycine :

La dihydrostreptomycine ne donnait aucune zone d'inhibition sur toutes les boîtes contenant du sulfate de magnésium. Sur les boîtes témoins la concentration 40 mcg/ml donnait une zone juste perceptible et la concentration 50 mcg/ml une zone petite mais très nette

Antibiotiques associés :

Sur les boîtes ayant reçu $MgSO_4$ 0,001 M à 0,1 M les trois antibiotiques associés donnaient des zones d'inhibition aux limites imprécises, dues à l'action de l'auréomycine.

Par contre, sur les géloses ayant reçu les solutions $MgSO_4$ M et 2 M, les zones d'inhibition correspondant aux concentrations 0,5 - 1 - 2 U/ml de pénicilline étaient normales et entièrement comparables aux doses correspondantes de pénicilline sur gélose avec $MgSO_4$ et sur gélose normale.

Plusieurs essais ont été renouvelés avec les solutions de sulfate de magnésium M et 2 M. Ils ont donné des résultats identiques. Il ne semble pas qu'il y ait de différences notables entre l'action de ces deux solutions de sulfate de magnésium en ce qui concerne la lecture des zones d'inhibition.

Nous avons donc retenu cette méthode par diffusion en gélose avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P en vue du dosage de la pénicilline en présence d'auréomycine et de dihydrostreptomycine.

Des dosages ont été effectués avec les solutions de sulfate de magnésium M et 2 M et nous en présenterons les résultats.

b) Action du cation Ca^{++}

Nous avons effectué des essais avec une solution de $CaCl_2, 2H_2O$ M, les conditions des essais restant les mêmes que précédemment.

Si la dihydrostreptomycine est inhibée jusqu'à la dose 50 mcg/ml, par contre l'auréomycine ne l'est pas et la concentration 0,5 mcg/ml donne déjà une petite zone d'inhibition.

La pénicilline ne subit aucune action mais les limites de ses zones d'inhibition sont moins nettes que sur les boîtes témoins.

Nous n'avons donc pas poursuivi ces essais.

2) Essais par turbidimétrie avec Staphylococcus aureus 101.

Nous avons recherché l'action de Mg^{++} sur l'auréomycine dans le dosage par turbidimétrie de la pénicilline avec Staphylococcus aureus 101.

Solution :

- solution de $MgSO_4$ 2 M stérile
- solutions de pénicilline donnant les concentrations finales dans les tubes de dosage : 0,01 - 0,02 - 0,03 U/ml.
- solution de pénicilline et auréomycine :
  auréomycine à concentration double de celle de la pénicilline (2 mcg pour 1 U).

Bouillon de dosage : formule XII, Pharmacopée française 1965.

- un flacon de bouillon avec 5 % de solution de $MgSO_4$ 2 M.
- un flacon de bouillon témoin avec 5 % d'eau distillée stérile.

Nous n'avons pas testé la dihydrostreptomycine qui ne présente pas d'action sur le germe-test dans les conditions du dosage.

Les deux séries de solutions antibiotiques ont été réparties dans les deux lots de bouillon.

Après 4 heures de bain-marie, nous avons procédé aux lectures des opacités, à 530 mμ. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessus. Nous donnons les moyennes des pourcentages de lumière transmise, pour quatre tubes par concentration.

Pénicilline U/ml		0,01	0,02	0,03	TG
Bouillon sans $MgSO_4$	Pénicilline seule	59	72	84	40
	Pénicilline + Auréo. (**)	96	96	96	
Bouillon + $MgSO_4$	Pénicilline seule	71	85	94	65
	Pénicilline + Auréo. (**)	74	88	96	

* TG : témoins germes sans antibiotiques

** Auréomycine : 0,02 - 0,04 - 0,06 mcg/ml.

Examen des résultats :

Dans le bouillon sans sulfate de magnésium les deux antibiotiques associés provoquent une inhibition totale.

Dans le bouillon additionné de sulfate de magnésium nous avons noté tout d'abord le retard de croissance du témoin germe, et le même retard de développement pour la gamme pénicilline seule.

L'auréomycine n'est que partiellement inhibée en présence de Mg^{++}.

Il semble que l'on puisse formuler une hypothèse : le staphylocoque subirait une action légèrement toxique sous l'effet de Mg^{++}, ce dont témoigne le retard de croissance dans le témoin bouillon.

D'autres essais, en faisant varier la concentration de $MgSO_4$ (solutions 0,1 M et M) n'ont pas donné d'amélioration.

Il apparaît donc que le dosage de la pénicilline ne puisse être effectué par cette méthode.

En conclusion, nos expériences préliminaires nous permettent d'envisager la réalisation des dosages suivants, dans l'association triantibiotique proposée, compte tenu des proportions relatives des trois antibiotiques.

Titrage de la pénicilline :

Diffusion en gélose avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, en présence de sulfate de magnésium, solution M ou 2M.

Titrage de la dihydrostreptomycine :

L'une des méthodes suivantes peut être proposée en vue du titrage :

1 - Diffusion en gélose avec Bacillus subtilis ATCC 6633 :

soit après inhibition de la pénicilline par la pénicillinase.

soit après inhibition totale de l'auréomycine et partielle mais suffisante de la pénicilline par le borohydrure de sodium.

soit après élimination de l'auréomycine par l'acétone-pipéridine, et neutralisation de la pénicilline par la pénicillinase.

2 - Turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031 :
soit après inhibition de la pénicilline et de l'auréomycine par le borohydrure de sodium.
soit après élimination de l'auréomycine par l'acétone-pipéridine.

3 - Diffusion en gélose avec staphylococcus "Delarue".

Titrage de l'auréomycine :

1 - Turbidimétrie avec Klebsiella pneumoniae ATCC 10031.

2 - Turbidimétrie avec staphylococcus aureus ATCC 6538 P :
après inhibition de la pénicilline par la pénicillinase.

3 - Turbidimétrie avec staphylococcus IP 52150 :
après inhibition de la pénicilline par la pénicillinase.

V - DOSAGES REALISES DANS L'ASSOCIATION PENICILLINE - DIHYDROSTREPTOMYCINE - AUREOMYCINE

Dosages réalisés dans l'association triantibiotique

- Résultats -

Nous exposons les résultats des titrages que nous avons réalisés, sans donner les protocoles de ces méthodes ; ceux-ci sont détaillés dans la partie "Annexe" de notre travail.

Nous nous sommes limités aux méthodes suivantes en raison de la simplicité et de la sécurité que présentait le traitement de l'échantillon :

dosage de la pénicilline :

diffusion en gélose en présence de sulfate de magnésium M et 2M.

germe-test : staphylococcus aureus ATCC 6538 P.

dosage de la dihydrostreptomycine :

diffusion en gélose avec B subtilis ATCC 6633

diffusion en gélose avec staphylococcus "Delarue".

dosage de l'auréomycine :

turbidimétrie avec S. aureus ATCC 6538 P

turbidimétrie avec S. aureus IP 52150

Nous avons ainsi, pour les dosages de la dihydrostreptomycine et de l'auréomycine, deux méthodes que nous pourrons comparer entre elles. En ce qui concerne la pénicilline nous n'avons réalisé qu'une méthode en effectuant deux titrages avec des concentrations différentes de sulfate de magnésium afin de déterminer la concentration la plus favorable.

Nous avons procédé, pour chaque dosage, à une analyse de variance destinée à tester la validité du titrage. Lorsque celle-ci est acquise l'activité de l'échantillon par rapport à l'étalon est évaluée, avec ses limites de confiance (24) (29).

Pour effectuer les calculs nous avons utilisé des données abrégées. Les tests statistiques de signification - test F des analyses de variance - ne sont pas affectés par cette modification.

Dans les dosages par diffusion en gélose nous avons établi les calculs statistiques selon la méthode inscrite à la Pharmacopée française, en utilisant des coefficients factoriels (Table III page 1811, 1965).

Pour les turbidimétries nous n'avons pu utiliser ces coefficients, les doses antibiotiques étant remplacées par leurs logarithmes, qui ne se trouvent plus régulièrement espacés.

Avant d'exposer les résultats des titrages nous indiquons la méthode d'extraction des antibiotiques que nous avons appliquée à la pommade triantibiotique. L'éther de pétrole a été choisi en raison de l'insolubilité des trois antibiotiques dans ce solvant :

Une prise d'essai de pommade de 1 à 2 g selon les dosages, est placée dans une ampoule à décantation. On ajoute 40 ml d'éther de pétrole et on agite jusqu'à dissolution complète.

L'extraction des antibiotiques est effectuée à l'aide du solvant généralement employé dans la méthode de titrage de l'antibiotique que l'on se propose de titrer. Le solvant est ajouté par fractions successives : 30 ml, 2 fois 25 ml et 15 à 18 ml, chaque addition étant suivie d'agitation et décantation.

Les extractums sont recueillis dans une fiole jaugée de 100 ml et le volume complété à 100 ml à l'aide du solvant utilisé dans la méthode de titrage à réaliser.

Dosage de la Pénicilline G sodique

Diffusion en gélose

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

Solution de $MgSO_4$ M

Etalon :

solution de benzylpénicillinate de sodium titrant 1000 U/ml, amenée par dilution en tampon pH 6, aux concentrations :

0,5 - 1 - 2 U/ml

Echantillon :

Prise d'essai : 2 g de pommade

dissolution : éther de pétrole

extraction : tampon pH 6, suivie de dilution en tampon pH 6 pour obtenir les concentrations théoriques :

0,5 - 1 - 2 U/ml

Ces solutions contiennent également en théorie :

1 - 2 - 4 mcg/ml d'auréomycine chlorhydrate

0,385 - 0,770 - 1,54 mcg/ml de dihydrostreptomycine base.

Milieux de dosage :

gélose de fond : Difco 2 contenant 5 % de solution de $MgSO_4$ M (soit 1,2 mg/ml Mg^{++})

gélose de surface : Difco 1 ensemencé et contenant 5 % de solution solution de $MgSO_4$ M (soit 1,2 mg/ml Mg^{++})

Lectures des diamètres de zones d'inhibition : réponses y.

Nous reproduisons cette lecture dans le tableau suivant. Nous appelons E_1, E_2, E_3, les trois concentrations de l'étalon correspondant respectivement à 0,5 - 1 - 2 U/ml, et X_1, X_2, X_3 celles de l'échantillon. Les diamètres des zones d'inhibition sont évalués au dixième de millimètre.

Lecture des diamètres des zones d'inhibition y

N° Boîtes de Pétri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td	m
E_1	12,0	13,0	11,2	12,6	12,0	11,8	12,0	12,1	11,6	108,3	12,0
X_1	12,2	13,4	12,0	12,6	12,0	12,0	12,2	12,4	12,0	110,8	12,3
E_2	15,4	16,3	16,4	16,4	16,4	15,9	16,4	15,5	15,8	144,5	16,0
X_2	15,6	16,6	16,7	16,7	16,4	16,3	16,6	15,2	16,2	146,3	16,2
E_3	20,0	19,4	19,3	19,9	20,4	20,0	19,7	20,0	19,8	178,5	19,8
X_3	20,3	19,9	19,1	19,9	20,8	20,0	20,0	20,4	19,6	180,0	20,0

Ces résultats permettent d'établir les courbes étalon E et échantillon X sur un graphique semi-logarithmique, en portant en abscisses (échelle logarithmique) les concentrations antibiotiques et en ordonnées (échelle arithmétique) les moyennes m des diamètres des zones d'inhibition correspondantes.

Afin de faciliter les calculs nous avons transformé les données y : celles-ci sont multipliées par 10 et diminuées de 110. Nous opérons les calculs de l'analyse de variance sur ces nouveaux chiffres qui figurent dans le tableau suivant.

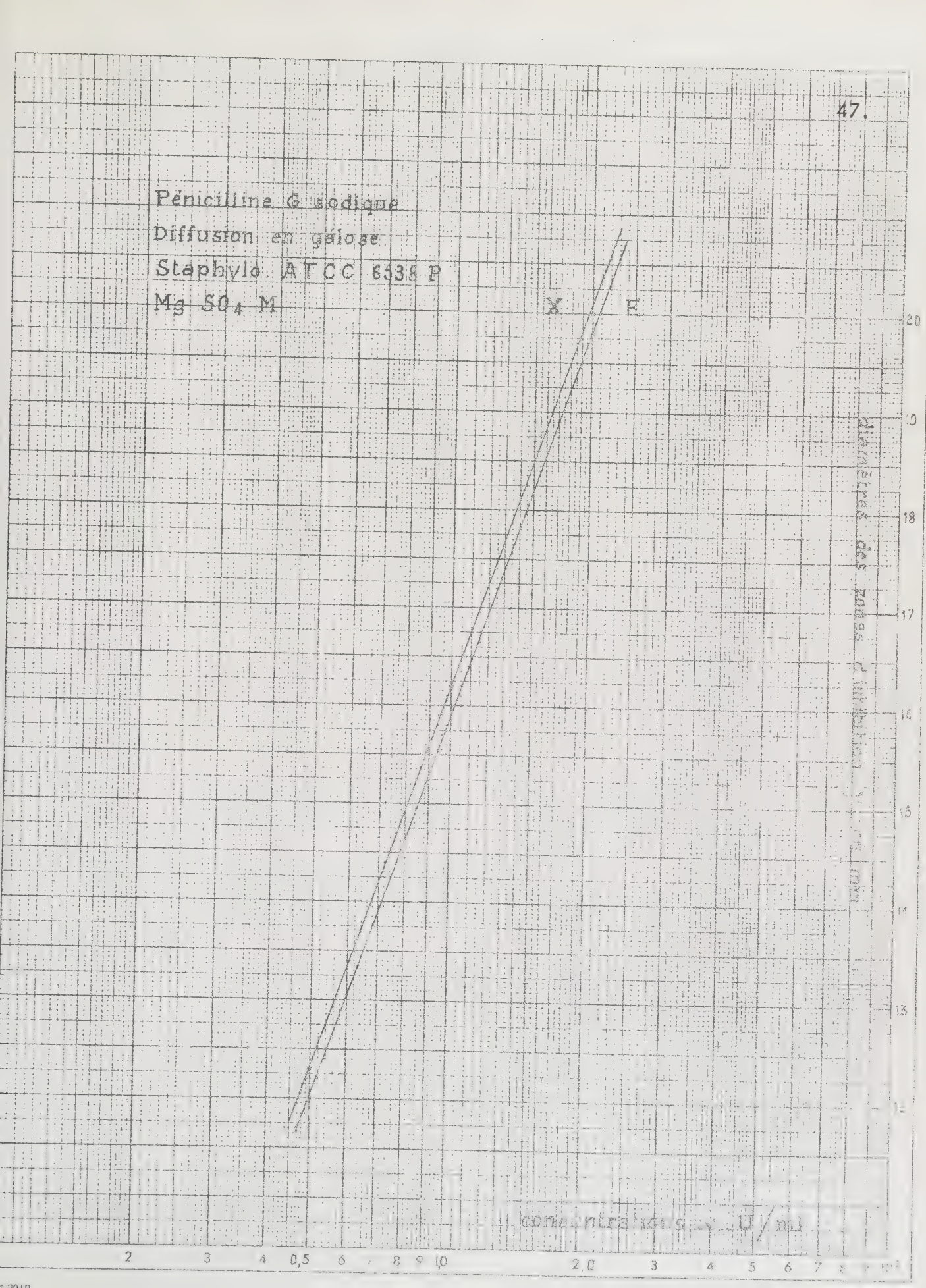
Td : représente les totaux par ligne, c'est à dire les totaux des 9 réponses à chaque concentration.

Tb : représente les totaux par colonne, c'est à dire les 6 réponses obtenues dans chaque boîte de Pétri.

T : représente le total général des valeurs y.

N : est le nombre total des mesures : 54

Pénicilline G sodique
Diffusion en gélose
Staphylo ATCC 6538 P
$Mg\ SO_4$ M



Diamètres des zones d'inhibition : y transformés

N° Boîtes de Pétri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td
E_1	10	20	2	16	10	8	10	11	6	93
X_1	12	24	10	16	10	10	12	14	10	118
E_2	44	53	54	54	54	49	54	45	48	455
X_2	46	56	57	57	54	53	56	42	52	473
E_3	90	84	83	89	94	90	87	90	88	795
X_3	93	89	81	89	98	90	90	94	86	810
Tb	295	326	287	321	320	300	309	296	290	T = 2 744

Analyse de variance

Elle est effectuée en deux analyses successives :

Première étape de l'analyse de variance :

L'analyse de variance permet de subdiviser la somme des carrés des 54 mesures y en :

- somme des carrés due aux doses, calculée avec Td
- somme des carrés due aux boîtes, calculée avec Tb
- reste, qui représente l'erreur expérimentale, dite aussi résiduelle, correspondant aux variations non contrôlées.

Etant donné que chaque concentration de l'échantillon figure dans chaque boîte de Pétri, on élimine les variations d'une boîte à l'autre et cette variation doit être soustraite de l'erreur expérimentale.

Calculs préliminaires :

(1) Somme des carrés des réponses y :

$$\Sigma y^2 = (10)^2 + (20)^2 + (2)^2 + \ldots\ldots + (86)^2 = 194\,518$$

(2) Correction due à la moyenne :

$$\frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{(2744)^2}{54} = 139\,435,85$$

(3) Somme des carrés due aux doses :

$$\frac{\Sigma Td^2}{9} = 193\,494,66$$

(4) Somme des carrés due aux boîtes :

$$\frac{\Sigma Tb^2}{6} = 139\,710$$

La somme des carrés due à l'erreur expérimentale est obtenue par différence entre la variation totale et les variations dues aux doses et aux boîtes.

Ces calculs permettent d'établir le premier tableau de l'analyse de variance.

Origine de la variation	Somme des Carrés	d.l	Carré moyen (variance)
Doses (3) - (2)	54 058,81	5	10 811,76
Boîtes (4) - (2)	282,15	8	35,26
Erreur expérim.	741,19	40	18,529
Total (1) - (2)	55 082,15	53	

Le nombre de degrés de liberté (d.l.) est égal au nombre de données moins un. Les degrés de liberté de l'erreur expérimentale sont obtenus par différence entre ceux de la variation totale et ceux des doses et boîtes.

Les carrés moyens (ou variances) sont calculés en divisant les sommes des carrés par les degrés de liberté correspondants.

Deuxième étape de l'analyse de variance :

La somme des carrés due aux doses, à laquelle est attaché 5 degrés de liberté, est décomposée en 5 sommes de carrés correspondant aux éléments de variation suivants :

a - Différence entre l'étalon et l'échantillon.

b - Pente combinée des deux droites de régression.

ab - Parallélisme des deux droites.

c - Manque de linéarité des deux droites combinées.

ac - Manque de linéarité des deux droites opposées.

Ces cinq sommes des carrés sont calculées à partir des totaux Td des neuf réponses par dose, à l'aide des coefficients figurant dans le tableau III "Coefficients pour essais factoriels" de la Pharmacopée française, page 1811, essai (3, 3).

Décomposition de la somme des carrés
due aux doses

	E_1	E_2	E_3	X_1	X_2	X_3	e_i	Ti	$Ti^2/e_i n$
Td	93	455	795	118	473	810			
a	-1	-1	-1	1	1	1	6	58	62,296
b	-1	0	1	-1	0	1	4	1394	53 978,777
ab	1	0	-1	-1	0	1	4	-10	2,777
c	1	-2	1	1	-2	1	12	-40	14,814
ac	-1	2	-1	1	-2	1	12	4	0,148

$e_i = \sum x_i^2$: Somme des carrés des valeurs des coefficients factoriels x_i

$Ti = \sum x_i Td$: Pour obtenir les valeurs Ti, on multiplie chaque total par dose Td, par le coefficient correspondant x_i et on effectue les totaux par ligne.

$Ti^2/e_i n$: Les totaux Ti, élevés au carré sont divisés par les produits $e_i n$, n étant le nombre de réponses par dose (ici n = 9).

Nous pouvons alors dresser le tableau de l'analyse de variance :

Source de variation	d.l	Somme des carrés	carré moyen (variance)	F. (P = 0,05)
a - Différence étalon-échantillon	1	62,296	62,296	3,36 N.S.
b - Pente combinée	1	53 978,777	53 978,777	2913 * *
ab - Manque de parallélisme	1	2,777	2,777	< 1 N.S.
c - Courbure combinée	1	14,814	14,814	< 1 N.S.
ac - Courbure opposée	1	0,148	0,148	< 1 N.S.
Total, Doses	5	54 058,812		

N.S. : non significatif.

* * : hautement significatif.

Conventionnellement, un astérisque placé après la valeur trouvée pour F indique que la cause de variation est significative (probabilité P comprise entre 5 % et 1 %) ; deux astérisques indiquent que la cause de variation est hautement significative (P inférieur à 1 %).

TEST F :

La dernière colonne F du tableau ci-dessus représente le rapport de chaque carré moyen au carré moyen de l'erreur expérimentale indiqué dans le premier tableau de l'analyse de variance. On cherche par cette comparaison à vérifier si la variation due aux facteurs contrôlés de l'expérience est explicable par l'ampleur de la variation due à l'erreur expérimentale.

F calculé est comparé à la valeur théorique de F trouvée dans les tables statistiques ; la valeur théorique est lue en fonction des nombres de degrés de liberté des sommes des carrés, au seuil de probabilité P = 0,05.

Si la valeur de F calculé est supérieure à celle de F théorique on conclut que la différence entre les deux groupes est significative.

Pour que l'essai soit valide il faut :

- que l'activité de l'échantillon diffère peu de celle de l'étalon.
  F trouvé : non significatif.
- que la variation due à la pente combinée soit hautement significative, c'est à dire que la pente soit suffisante pour assurer une bonne sensibilité au titrage.
  F trouvé : hautement significatif.
- que les droites soient parallèles et ne présentent pas de courbures (ab, c et ac non significatifs), ce qui est notre cas.

Le titrage est donc valide et le titre M est calculé :

Calcul du titre M

M est donné par la formule :

$$M = 4/3\ i\ Ta/Tb$$

dans laquelle :

4/3 est un coefficient pour les essais à 3 doses

i est le logarithme de la raison de la progression entre les doses ($i = 0,301$).

$a = 58$

$Tb = 1394$

ces deux valeurs ont été calculées précédemment.

$$M = 3/4 \times 0,301 \times \frac{58}{1394} = 0,01604$$

dont l'antilogarithme est 1,037625.

L'échantillon a donc 1,038 fois l'activité de l'étalon.

Exprimé en pourcentages, le titre est

$M = 103,8\ \%$

Exprimé en unités de pénicilline, le titre de l'échantillon est de :

500 000 x 103,8 % = 519 900 unités de pénicilline G sodique pour 100 g de pommade.

Limites de confiance du titre M : $M \pm t\, s_M$

Ces limites sont calculées à partir de l'écart-type s_M du logarithme du titre M, grâce à la formule :

$$s_M = 4\ is \sqrt{18\left(3 + 2\,\frac{Ta^2}{Tb^2}\right)} \Big/ 3\ Tb$$

dans laquelle s représente l'écart-type de la variance résiduelle

$$s = \sqrt{18,529} = 4,304$$

$$s_M = 4 \times 0,301 \times 4,304 \sqrt{18\left(3 + 2\,\frac{(58)^2}{(1394)^2}\right)} \Big/ 3 \times 1394$$

$$s_M = 0,009110$$

Les limites de confiance sont égales à $\pm\, t\, s_M$. La valeur de t (t de Student), donnée par les tables statistiques, pour 40 degrés de liberté de la variance résiduelle et P = 0,05, est égale à 2.

$$\pm\ 2 \times 0,00911$$

$$\pm\ 0,01822$$

ou encore, exprimées en pourcentages :

$$2 \pm 0,01822$$

soit 1,98178 et 2,01822 dont les antilogarithmes sont 95,89 et 104,235.

Les limites de précision du titrage sont 95,9 % et 104,3 %.

Dosage de la Pénicilline G sodique

Diffusion en gélose

Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

Solution de $MgSO_4$ 2M

Ce dosage a été effectué le même jour que celui que nous venons de présenter : Pénicilline G sodique en présence de $MgSO_4$ M.

De cette façon les lots de gélose, Difco 1 et Difco 2 étaient identiques, de même que l'inoculum et les solutions antibiotiques.

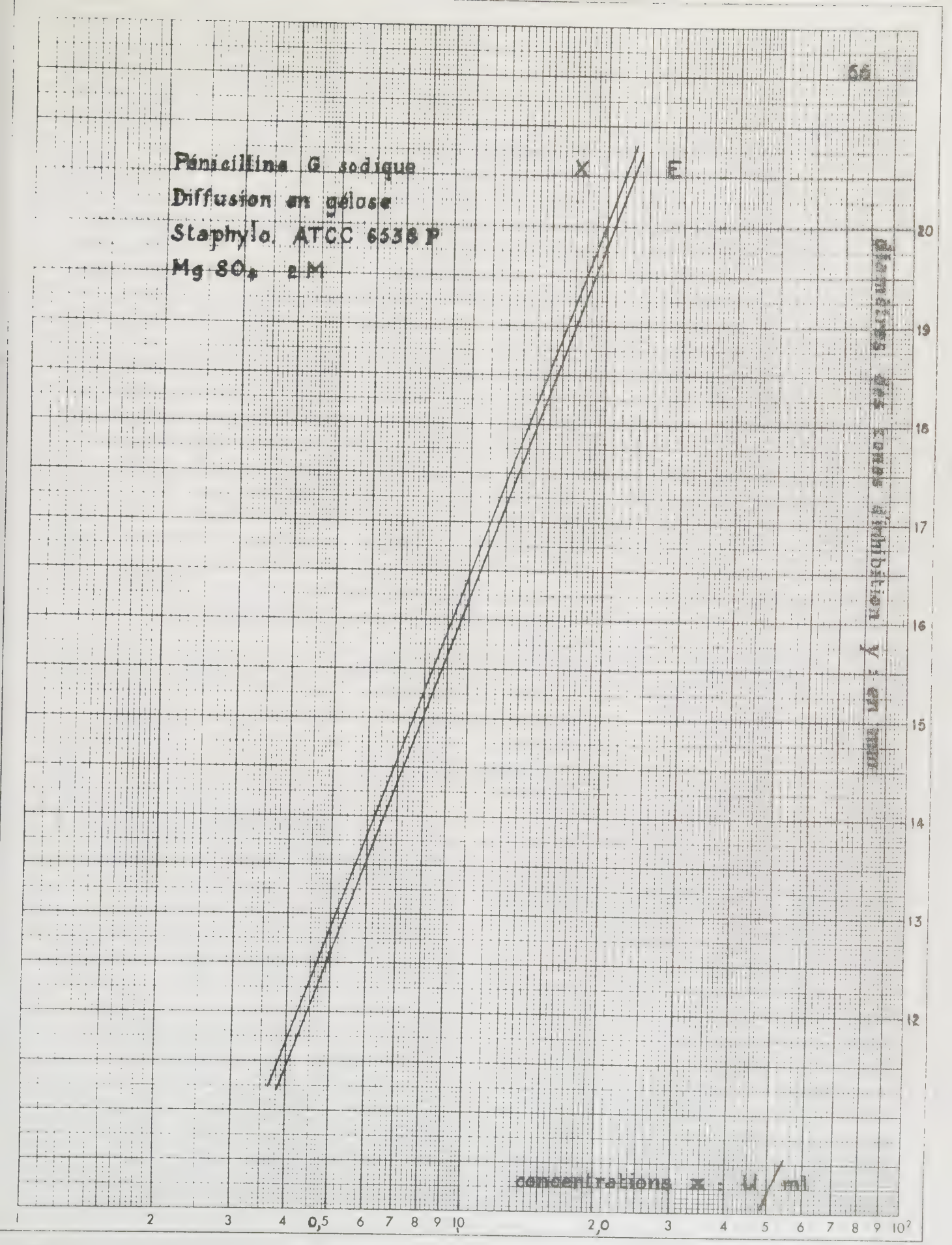
La seule différence concernait les solutions de sulfate de magnésium dont nous désirions tester l'action (les géloses contiennent 2,4 mg/ml d'ions Mg^{++}).

Dans les pages suivantes nous résumons les résultats :

- tableau des lectures des diamètres des zones d'inhibition y et courbes du dosage.
- tableau des y transformés sur lesquels sont effectués les calculs.
- analyse de variance : test de validité du titrage.
- calcul du titre et de ses limites de confiance.

Lecture des diamètres des zones d'inhibition : y

N° boîtes de Pétri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td	m
E_1	12,0	12,0	13,2	12,2	13,0	12,3	12,6	13,2	12,6	113,1	12,6
X_1	12,4	12,0	13,4	12,6	13,2	12,8	12,6	13,2	12,6	114,8	12,8
E_2	16,1	16,4	16,0	16,2	15,6	16,6	16,0	16,4	17,0	146,3	16,2
X_2	16,4	16,2	16,3	16,2	16,0	16,8	16,2	16,7	17,0	147,8	16,4
E_3	19,4	19,4	20,4	20,4	19,0	20,0	18,4	20,8	21,0	177,8	19,8
X_3	19,4	19,8	20,5	20,6	19,5	20,1	18,8	20,7	19,8	179,2	19,9


Pénicilline G sodique
Diffusion en gélose
Staphylo. ATCC 6538 P
Mg SO4 2 M
X
E
diamètres des zones d'inhibition Y en mm
concentrations x - U/ml
0,5
2,0

Diamètres des zones d'inhibitions : y transformés

(y x 10) - 120

N° boîtes de Pétri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td
E_1	0	0	12	2	10	3	6	12	6	51
X_1	4	0	14	6	12	8	6	12	6	68
E_2	41	44	40	42	36	46	40	44	50	383
X_2	44	42	43	42	40	46	42	47	50	398
E_3	74	74	84	84	70	80	64	88	80	698
X_3	74	78	85	86	75	81	68	87	78	712
Tb	237	238	278	262	243	266	226	290	270	T=2310

Analyse de variance

Calculs préliminaires :

(1) Somme des carrés des réponses y :

$$\Sigma y^2 = (12)^2 + (2)^2 + (10)^2 + \ldots\ldots + (78)^2 = 146.512$$

(2) Correction due à la moyenne :

$$\frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{(2310)^2}{54} = 98\,816,66$$

(3) Somme des carrés due aux doses :

$$\frac{\Sigma Td^2}{9} = 145\,162,88$$

(4) Somme des carrés due aux boîtes :

$$\frac{\Sigma Tb^2}{6} = 99\,437$$

Premier tableau de l'analyse de variance :

Origine de la variation	Somme des Carrés	d.l	Carré moyen (variance)
Doses (3) - (2)	46 346,22	5	9 269,244
Boîtes (4) - (2)	620,34	8	77,542
Erreur expérimentale	728,78	40	18,219
Total (1) - (2)	47 695,34	53	

Deuxième étape de l'analyse de variance :

La somme des carrés due aux doses est décomposée en cinq sommes de carrés qui sont calculées à l'aide des coefficients pour essais factoriels :

	E_1	E_2	E_3	X_1	X_2	X_3	e_i	Ti	$Ti^2 e_i n$
Td	51	383	696	68	398	712			
a	-1	-1	-1	1	1	1	6	1046	39,185
b	-1	0	1	-1	0	1	4	1291	46 296,694
ab	1	0	-1	-1	0	1	4	-3	0,250
c	1	-2	1	1	-2	1	12	-33	10,083
ac	-1	2	-1	1	-2	1	12	1	0,009

Ces calculs permettent de dresser le second tableau de l'analyse de variance :

Source de Variation	d.l	Somme des Carrés	Carré moyen (variance)	F (P = 0,05)	
a - Différence étalon-échantillon	1	39,185	39,185	2,15	N.S.
b - Pente combinée	1	46 296,694	46 296,694	2541	* *
ab - Manque de parallélisme	1	0,250	0,250	< 1	N.S.
c - Courbure combinée	1	10,083	10,083	< 1	N.S.
ac - Courbure opposée	1	0,009	0,009	< 1	N.S.
Total, Doses	5				

N.S. : non significatif.

* * : hautement significatif

F théorique pour P = 0,05 : $F^{1}_{40} = 4,08$, $F^{8}_{40} = 2,18$, $F^{5}_{40} = 2,45$

Pour que l'essai soit valide il faut que le terme b soit significatif, témoignant de l'existence d'une pente suffisante, et que les termes a, ab, c, ac soient "non significatifs" : les droites sont parallèles et ne présentent pas de courbure.

Conclusion : le titrage est valide.

Calcul du titre M :

$$M = 4/3 \times i \times \frac{Ta}{Tb}$$

$4/3 \times i = 0,401$

$Ta = 46$

$Tb = 1291$

$$M = 0,401 \times \frac{46}{1291} = 0,01427$$

dont l'antilogarithme est 0,0334

Exprimé en pourcentage le titre est 103,34

M = 103,3 %

Titre de l'échantillon en unités de pénicilline :

500 000 x 103,3 = 516 500 U. de pénicilline G sodique pour 100 g pommade.

Limites de confiance du titre M : $M \pm t\, s_M$

Ecart-type s_M du logarithme du titre M :

$$s_M = 4\, is \sqrt{18\left(3 \times 2\,\frac{Ta^2}{Tb^2}\right)} \Big/ 3\,Tb$$

i = 0,301

$s = \sqrt{18,22} = 4,268$

Ta = 46

Tb = 1291

$$s_M = 4 \times 0,301 \times 4,268 \sqrt{18\left(3 + 2\,\frac{(46)^2}{(1291)^2}\right)} \Big/ 3 \times 1291$$

$s_M = 0,00975$

Les limites de confiance sont donc pour P = 0,05 et t = 2 :

$\pm$ 2 x 0,00975

$\pm$ 0,0195

ou, si l'on exprime ces limites en pourcentage :

2 $\pm$ 0,0195

soit 1,98050 et 2,0195, dont les antilogarithmes sont : 95,61 et 104,59

Les limites de précision du titrage sont : 95,6 % et 104,6 %.

Résultats des deux titrages de la Pénicilline G sodique :

	Titre trouvé	Limites de confiance du titrage
Solution $MgSO_4$ M	103,8 %	95,9 - 104,3 %
Solution $MgSO_4$ 2 M	103,3 %	95,6 - 104,6 %

Conclusion :

Les deux résultats sont superposables et l'on peut utiliser indifféremment une solution M ou 2 M de sulfate de magnésium, à raison de 5 % dans les géloses, pour éviter l'interférence de l'auréomycine dans le cas où le rapport des concentrations est de 1 U. de pénicilline pour 2 mcg d'auréomycine.

Dosage de la Dihydrostreptomycine

Diffusion en Gélose

Bacillus subtilis ATCC 6633

Etalon

Solution de sulfate de dihydrostreptomycine titrant 1000 mcg/ml, exprimés en dihydrostreptomycine base par millilitre de solution, amenée, par dilution en tampon phosphaté pH 8, aux concentrations :

1 - 2 - 4 mcg/ml

Echantillon :

Prise d'essai : 2,5974 g de pommade.

Extraction et élimination de l'auréomycine et de la pénicilline :

- La prise d'essai, déposée sur le verre fritté (porosité 4) d'un tube d'Allihn de 30 ml, est dissoute avec 5 fois 10 ml d'isooctane, tiédi vers 60°C afin de faciliter la dissolution. Le solvant est éliminé par aspiration sous vide moyen.
- Les trois antibiotiques restés sur le filtre sont lavés avec 4 fois 10 ml d'acétone contenant 0,3 % de pipéridine, par aspiration sous vide. L'auréomycine se trouve ainsi éliminée et le filtrat est rejeté.
- La dihydrostreptomycine et la pénicilline restées sur le filtre sont mises en solution à l'aide d'eau distillée stérile, 90 ml environ, et le filtrat recueilli dans une fiole jaugée de 100 ml. La solution, qui titre théoriquement 100 mcg/ml de dihydrostreptomycine base et 130 U/ml de pénicilline, est additionnée de 0,1 ml de pénicillinase et placée 1 heure à 37°C.

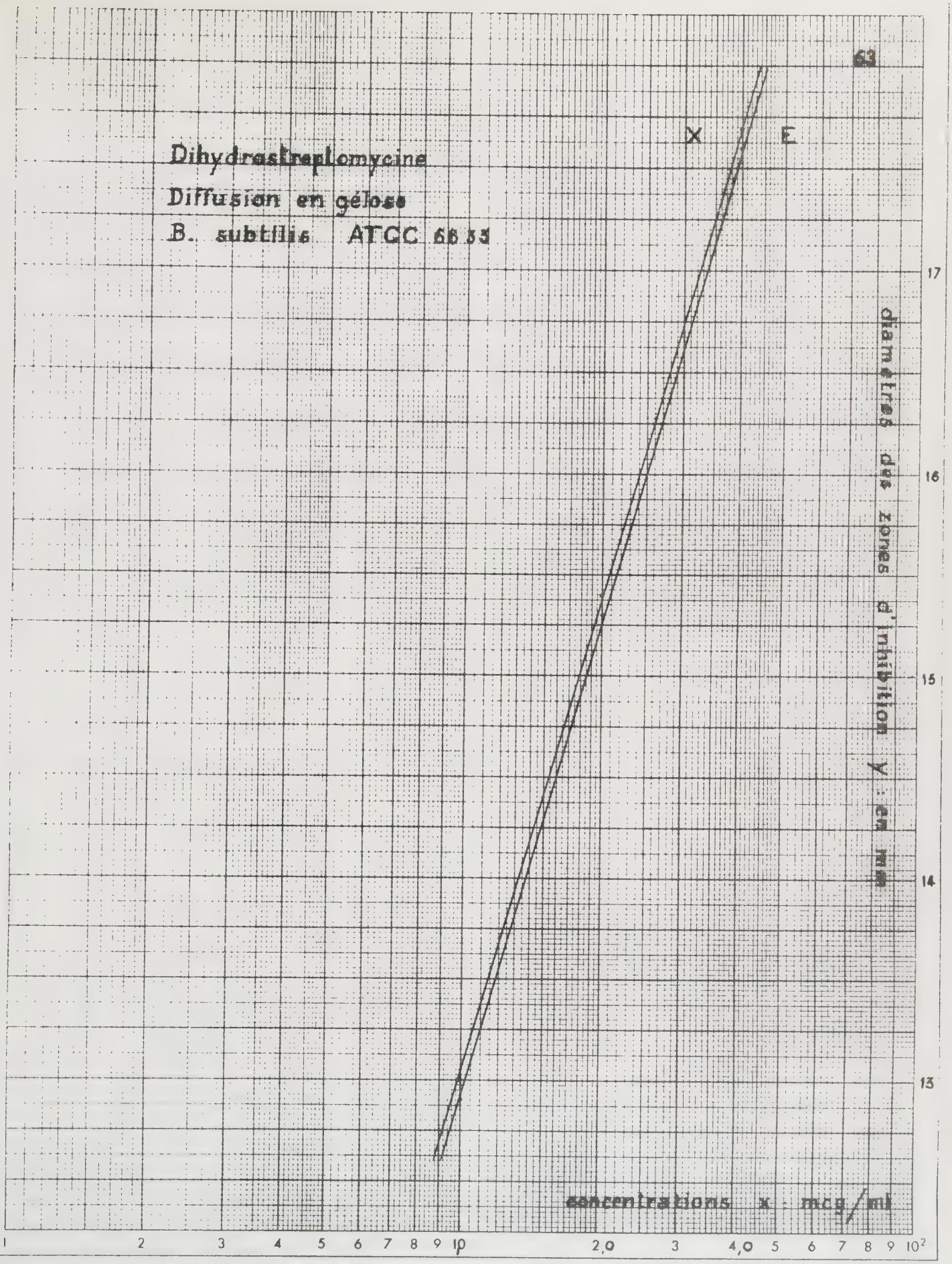
- Après hydrolyse de la pénicilline, la solution ne contient plus que la dihydrostreptomycine.
  Des dilutions sont effectuées en tampon pH 8 pour obtenir les concentrations :
  1 - 2 - 4 mcg/ml de dihydrostreptomycine base.

Les diverses opérations ultérieures sont décrites dans la technique de dosage que nous utilisons, indiquée en "Annexe".

Nous présentons le tableau des lectures des diamètres des zones d'inhibition et l'interprétation statistique du titrage dans les pages suivantes.

Diamètres des zones d'inhibition : y

N° boîtes de Pétri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td	m
E_1	13,0	12,9	12,8	12,9	13,0	13,0	12,9	13,1	13,0	116,6	12,9
X_1	13,0	12,9	13,0	12,8	13,0	12,9	13,1	13,2	13,3	117,2	13,0
E_2	15,5	15,3	15,6	15,4	15,0	15,0	15,4	15,2	15,7	138,1	15,3
X_2	15,5	15,4	15,6	15,6	15,2	15,2	15,5	15,3	15,6	138,9	15,4
E_3	17,8	17,5	17,0	18,0	17,5	18,0	17,5	17,8	17,6	158,7	17,6
X_3	17,9	17,5	17,1	18,1	17,6	18,0	17,6	17,9	17,7	159,4	17,7


Dihydrostreptomycine
Diffusion en gélose
B. subtilis ATCC 6633
X
E
diamètres des zones d'inhibition Y : en mm
17
16
15
14
13
concentrations x : mcg/ml
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
2,0
3
4,0
5
6
7
8
9
10²

Diamètres y transformés : (y x 10) - 120

N° des boîtes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td
E_1	10	9	8	9	10	10	9	11	10	86
X_1	10	9	10	8	10	9	11	12	13	92
E_2	35	33	36	34	30	30	34	32	37	301
X_2	35	34	36	36	32	32	35	33	36	309
E_3	58	55	50	60	55	60	55	58	56	507
X_3	59	55	51	61	56	60	56	59	57	514
Tb	207	195	191	208	193	201	200	205	209	T = 1809

Calculs préliminaires permettant d'établir le premier tableau de l'analyse de variance :

(1) Somme des carrés des réponses y :

$$\Sigma y^2 = (10)^2 + (9)^2 + (8)^2 + \ldots\ldots\ldots + (57)^2 = 60\,603$$

(2) Correction due à la moyenne :

$$\frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{(1809)^2}{54} = 60\,601,50$$

(3) Somme des carrés due aux doses :

$$\frac{\Sigma Td^2}{9} = 60\,354,11$$

(4) Somme des carrés due aux boîtes :

$$\frac{\Sigma Tb^2}{6} = 60\,662,50$$

Premier tableau de l'analyse de variance :

Origine de la variation	Somme des carrés	d.l	Carré moyen
Doses (3) - (2)	19 752,61	5	3 950,522
Boîtes (4) - (2)	61,00	8	7,625
Erreur expérim.	187,89	40	4,697
Total (1) - (2)	10 001,50	53	

Deuxième étape de l'analyse de variance :

La somme des carrés due aux doses est décomposée en cinq sommes de carrés correspondant à cinq sources de variations différentes, calculées à l'aide des coefficients pour essais factoriels :

	E_1	E_2	E_3	X_1	X_2	X_3	e_i	T	$T^2 e_i^n$
Td	76	301	507	92	309	514			
a	-1	1	-1	1	1	1	6	21	8,166
b	-1	0	1	-1	0	1	4	843	19 740,250
ab	1	0	-1	-1	0	1	4	1	0,027
c	1	2	1	1	-2	1	12	-21	4,084
ac	-1	2	-1	1	-2	1	12	-3	0,084

Ces cinq sommes des carrés permettent de dresser le second tableau de l'analyse de variance.

Sources de variation	d.l	Somme des carrés	Carré moyen (variance)	F (P = 0,05)	
a - Différence étalon-échantillon	1	8,166	8,166	1,73	N.S.
b - Pente combinée	1	19 740,250	19 740,250	4202	* *
ab - Manque de parallélisme	1	0,027	0,027	< 1	N.S.
c - Courbure combinée	1	4,084	4,084	< 1	N.S.
ac - Courbure opposée	1	0,084	0,084	< 1	N.S.
Total, Doses	5	19 752,611			

N.S. : non significatif

* * : hautement significatif

La validité du titrage est mise en évidence :

la pente combinée des deux antibiotiques est hautement significative tandis que les autres causes de variations - manque de parallélisme et courbures diverses - ne le sont pas. De plus la différence étalon-échantillon n'est pas significative : l'activité de l'échantillon est donc proche de celle de l'étalon.

Calcul du titre M :

$$M = 4/3 \times i \times \frac{Ta}{Tb}$$

$$M = 0,401 \times \frac{21}{843} = 0,00998$$

Exprimé en pourcentage, le titre correspondant à l'antilogarithme de 2,00998 est : 102,325.

M = 102,3 %

Le titre de l'échantillon est donc, exprimé en gramme de dihydrostreptomycine base :

0,385 x 1,023 = 0,393855 arrondi à 0,394 g de dihydrostreptomycine base pour 100 g de pommade.

Limites de confiance du titre M : $M \pm t\, s_M$

Ecart-type s_M du logarithme du titre M :

$$s_M = 4 \times i \times s \sqrt{18 \left(3 + 2 \frac{Ta^2}{Tb^2}\right)} \Big/ 3\, Tb$$

$$s = \sqrt{4,69} = 2,167$$

$$s_M = 4 \times 0,301 \times 2,167 \sqrt{18 \left(3 + 2 \frac{(21)^2}{(843)^2}\right)} \Big/ 3 \times 843$$

$$s_M = 0,00758$$

Les limites de confiance sont donc pour P = 0,05 et t = 2 :

$\pm$ 2 x 0,00758

$\pm$ 0,01516

ou, pour exprimer ces limites en pourcentage :

$2 \pm 0,01516$

soit 1,98484 et 2,01516 dont les antilogarithmes sont 96,57 et 103,5525.

Les limites de précision du titrage sont donc :

96,6 % et 103,6 %

Dosage de la Dihydrostreptomycine

Diffusion en gélose

Staphylococcus "Delarue"

Etalon

- Solution de sulfate de dihydrostreptomycine, titrant 1000 mcg/ml, titre exprimé en dihydrostreptomycine base par millilitre de solution.
- Dilutions en tampon pH 8 :

  5 - 10 - 20 mcg/ml

Echantillon

- Prise d'essai : 2, 5974 g de pommade
- Dissolution : éther de pétrole
- Extraction : tampon pH 8
- Dilutions : effectuées en tampon pH 8, pour obtenir les concentrations théoriques :

  5 - 10 - 20 mcg/ml, dihydrostreptomycine base

Le germe-test utilisé étant résistant à l'auréomycine et à la pénicilline, aucun traitement n'est nécessaire pour éliminer ces deux antibiotiques.

Le dosage est poursuivi selon la technique indiquée en "Annexe".

Lecture des zones d'inhibition :

Lectures des diamètres des zones d'inhibition : y

N° boîtes de Pétri	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Td	m
E_1	13,2	12,9	13,5	13,9	13,0	12,8	12,8	13,0	13,0	118,1	13,1
X_1	12,8	13,2	13,7	13,9	12,8	12,8	13,0	12,8	13,2	118,2	13,1
E_2	14,5	15,0	14,4	14,4	15,0	14,7	15,2	15,0	14,7	132,9	14,8
X_2	14,6	15,0	14,8	14,6	15,0	15,0	15,0	15,3	15,0	134,3	14,9
E_3	16,4	16,4	17,0	16,7	16,8	16,9	16,2	16,6	16,4	149,4	16,6
X_3	16,8	16,6	17,2	17,0	16,7	16,8	16,2	16,7	16,5	150,5	16,7
Tb	88,3	89,1	90,6	90,5	89,3	89,0	88,4	89,4	88,8	T=803,4	

Afin de tester la validité de ce titrage nous procédons à l'analyse de variance classique. Celle-ci ayant été détaillée lors du premier dosage de pénicilline, nous ne donnons que les résultats des calculs.

Les calculs ont été effectués à l'aide des données du tableau ci-dessus multipliées par 10.

Analyse de variance.

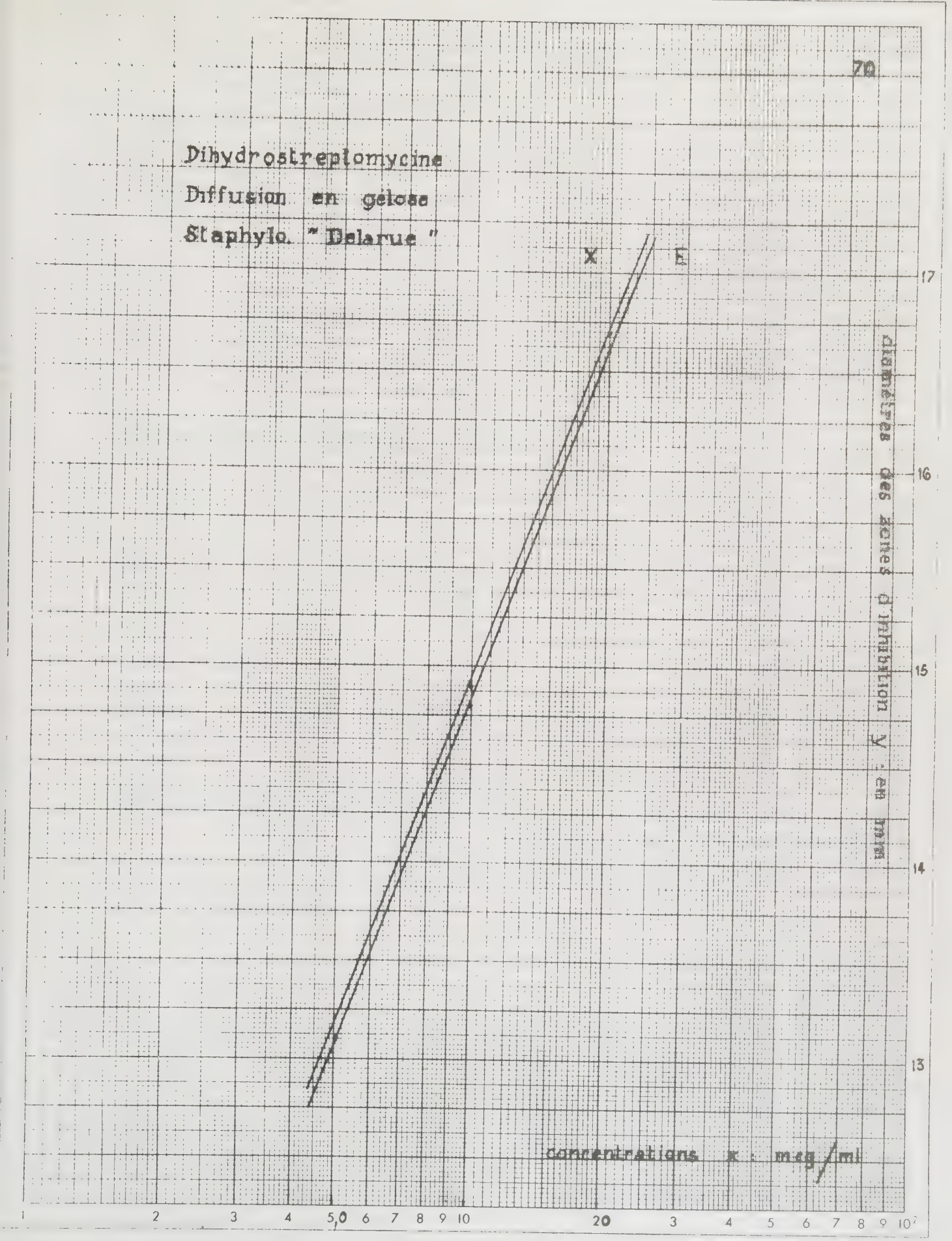
Calculs préliminaires :

(1) Somme des carrés des réponses y :

$$\Sigma y^2 = (132)^2 + (129)^2 + \ldots\ldots + (165)^2 = 1\ 207,854$$

(2) Correction due à la moyenne :

$$\frac{(\Sigma y)^2}{N} = \frac{(8034)^2}{54} = 1\ 195\ 280,66$$


Dihydrostreptomycine
Diffusion en gelose
Staphylo. " Delarue "
X
E
diamètres des zones d'inhibition Y : en mm
17
16
15
14
13
concentrations x : mcg/ml
1
2
3
4
5,0
6
7
8
9
10
20
3
4
5
6
7
8
9
10²

(3) Somme des carrés due aux doses :

$$\frac{Td^2}{9} = 1\ 206\ 537,33$$

(4) Somme des carrés due aux boîtes :

$$\frac{Tb^2}{6} = 1\ 195\ 369,33$$

Premier tableau de l'analyse de variance :

Origine de la variation	Somme des Carrés	d.l	Carré moyen
Doses (3) - (2)	11 256,67	5	2 251,33
Boîtes (4) - (2)	88,67	8	11,08
Erreur expérim.	1 228	40	30,70
Total (1) - (2)	12 573,34	53	

Deuxième étape de l'analyse de variance :

La somme des carrés due aux doses, à laquelle correspond 5 degrés de liberté, est décomposée en 5 sommes de carrés qui sont calculées à l'aide des coefficients factoriels :

	E_1	E_2	E_3	X_1	X_2	X_3	e_i	T_i	$T_i^2/e_i n$
Td	1181	1329	1494	1182	1343	1505			
a	-1	-1	-1	1	1	1	6	26	12,518
b	-1	0	1	-1	0	1	4	636	11 236
ab	1	0	-1	-1	0	1	4	10	2,777
c	1	-2	1	1	-2	1	12	18	3
ac	-1	2	-1	1	-2	1	12	-16	2,370

Second tableau de l'analyse de variance :

Sources de variation	d .l	Somme des carrés	Carré moyen (variance)	F (P = 0,05)	
a - Différence étalon-échantillon	1	12,518	12,518	< 1	N.S.
b - Pente combinée	1	11 236	11 236	366	* *
ab - Manque de parallélisme	1	2,777	2,777	< 1	N.S.
c - Courbure combinée	1	3	3	< 1	N.S.
ac - Courbure opposée	1	2,370	2,370	< 1	N.S.
Total, Doses	5	11 256,665			

N.S. : non significatif

* * : hautement significatif.

Le dosage est valide étant donné que les termes correspondant à a, ab, c, ac sont "non significatifs" : les droites sont parallèles et ne présentent pas de courbures. En outre il n'y a pas de différence entre l'étalon et l'échantillon. Enfin la pente est bien marquée : terme b hautement significatif.

Calcul du titre M

$$M = 0,3 \times i \times \frac{Ta}{Tb} .$$

$$M = 0,401 \times \frac{26}{636} = 0,01639$$

Exprimé en pourcentage le titre est : antilog. de 2,01639 = 103,846

M = 103,8 %

Titre de l'échantillon en gramme de dihydrostreptomycine base :

0,385 x 1,038 = 0,39963, arrondi à 0,4 g de dihydrostreptomycine base pour 100 g de pommade.

Limites de confiance du titre M : $M \pm t\, s_M$

Ecart-type du logarithme du titre M :

$$s_M = 4\ is \sqrt{18\left(3 + 2\frac{Ta^2}{Tb^2}\right)} \Big/ 3\ Tb$$

$$s_M = 4 \times 0,301 \times 5,54 \sqrt{18\left(3 + 2\frac{(26)^2}{(636)^2}\right)} \Big/ 3 \times 636$$

$$s_M = 0,0256$$

Les limites de confiance sont donc pour P = 0,05 et t = 2

$\pm$ 2 x 0,0256

$\pm$ 0,0512

ou si l'on exprime ces limites en pourcentage :

2 $\pm$ 0,0512

soit 1,9488 et 2,0512 dont les antilogarithmes sont : 88,88 et 112,515

Les limites de précision du titrage sont : 89 % et 112,5 %

Comparaison des résultats obtenus
par les deux méthodes de titrage de la dihydrostreptomycine.

	Titre trouvé M	Limites de confiance du titrage
Diffusion en gélose B. subtilis ATCC 6633	102,3 %	96,6 - 108,6 %
Diffusion en gélose Staphylococcus "Delarue"	103,8 %	89 - 112,5 %

Les titres trouvés par ces deux techniques de diffusion en gélose sont très proches l'un de l'autre.

On remarque cependant le grand intervalle de confiance obtenu dans la méthode utilisant le staphylocoque. Ceci est dû à la différence de sensibilité des deux germes vis-à-vis de la dihydrostreptomycine, dans les conditions des dosages. La sensibilité relative du staphylocoque, vis-à-vis des doses espacées en progression géométrique de raison 2, est un peu moins grande que celle du B. subtilis. La pente des droites dans le dosage utilisant le staphylocoque est d'ailleurs moins forte, ce qui se traduit par un écart-type plus élevé.

La technique de diffusion avec B. subtilis comme germe-test reste donc la méthode de choix en vue du titrage de la dihydrostreptomycine. Cependant, chaque fois que cet antibiotique se trouve associé à l'auréomycine, la méthode de diffusion en gélose avec Staphylococcus "Delarue" permet un titrage facile et sûr.

Dosage de l'Auréomycine

Turbidimétrie

Staphylococcus aureus IP 52150

Etalon

Solution de chlorhydrate d'auréomycine titrant 1000 mcg/ml amenée, par dilution en tampon pH 6, aux concentrations :

0,06 - 0,08 - 0,10 - 0,12 - 0,14 mcg/ml

Echantillon

Prise d'essai : 1 g de pommade

Dissolution : éther de pétrole

Extraction : tampon pH 6

Avant de compléter à 100 ml, la solution est additionnée de pénicillinase : 0,2 ml de solution de pénicillinase, quantité largement suffisante pour hydrolyser la pénicilline (5000 U) présente dans la prise d'essai.

La solution est placée 1 h 30 à l'étuve à 37°, puis complétée à 100 ml à l'aide de tampon pH 6 et diluée en tampon pH 6 de façon à obtenir :

0,08 - 0,10 - 0,12 mcg/ml de chlorydrate d'auréomycine.

Ces solutions contiennent également :

0,0308 - 0,0385 - 0,0462 mcg/ml de dihydrostreptomycine base, qui ne gêne pas le dosage de l'auréomycine.

Lecture des réponses y : opacités microbiennes

Lecture en pourcentage de lumière transmise (% LT), à la longueur d'onde 530 mμ, le zéro du photomètre (100 % LT) étant établi à l'aide du tube témoin bouillon non ensemencé.

Les résultats suivants on été obtenus après 4 h 15 de bain-marie à 37° :

doses x : mcg/ml	0,006	0,008	0,010	0,012	0,014	TG (*)
réponses y : % LT	68	74	78	82	84	58
	68	74	78	81,5	85	58
Etalon	68	73,5	78	82	85,5	58
Σ :	204	221,5	234	245,5	254,5	174
m :	68	73,8	78	81,8	84,8	58
Echantillon		73	77	81		
		73,5	76,5	79		
		72,5	78	79		
Σ :		219	231,5	239		
m :		73	77,2	79,6		

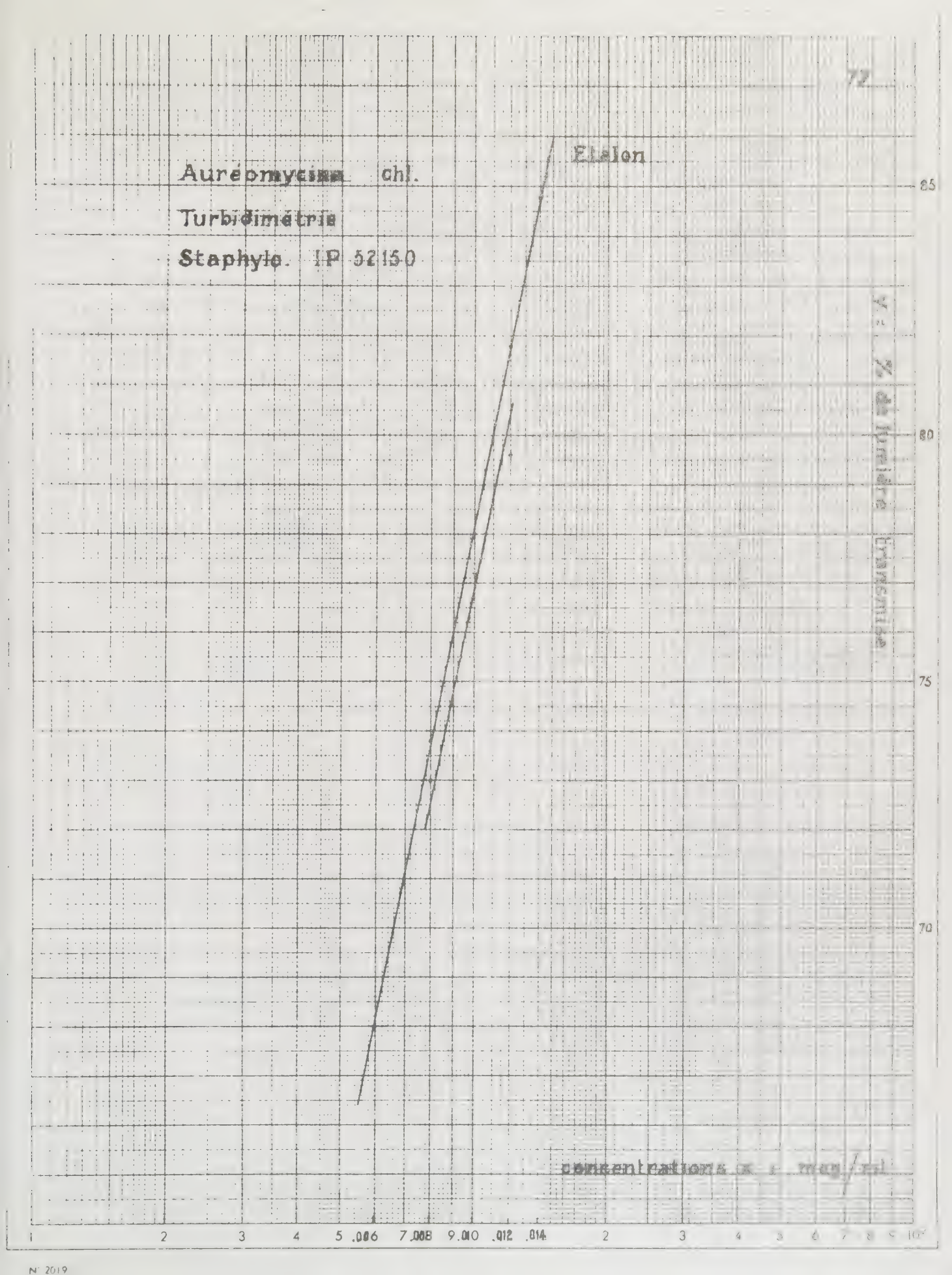
* TG : témoin germe.

Le tracé des courbes sur graphique semi-logarithmique indique que nous obtenons des droites entre les concentrations x = 0,008 et 0,012 mcg/ml, donc que nous avons une relation linéaire entre y et log x.

Pour nous en assurer et tester la validité de ce dosage nous effectuons une analyse de variance. Si la validité est établie nous calculerons le titre de l'échantillon et ses limites de confiance.

Simplification des x :

Pour effectuer les calculs nous avons utilisé les log. doses situés sur la partie linéaire des droites. Ces doses étant 0,008 - 0,010 et 0,012 mcg/ml, nous avons pris les logarithmes des doses multipliées par 10 000, que nous avons simplifiés afin d'obtenir des chiffres faciles à utiliser.


72
Elelon
Auréomycine chl.
Turbidimétrie
Staphylo. IP 52150
85
80
75
70
% d'inhibition
concentrations en γ / ml
1
2
3
4
5 .006
7 .008
9 .010
.012
.014
2
3
4
5
6
7
8
10²

N° 2019

Calculs Préliminaires

	Etalon S			Echantillon P		
log. doses x (simplifiés)	- 5	0	+	- 5	0	+ 4
réponses y	74 74 73,5	78 78 78	82 81,5 82	73 73,5 72,5	77 76,5 78	81 79 79
Σy_i	221,5	234	245,5	219	231,5	239
$\Sigma y = 1390,5$	$\Sigma y_s = 701$			$\Sigma y_p = 689,5$		
$(\Sigma y)^2 = 1\ 933\ 490,25$	$(\Sigma y_s)^2 = 491\ 401$			$(\Sigma y_p)^2 = 475\ 410,25$		
$\bar{y}$	$\bar{y}_s = 77,88$			$\bar{y}_p = 76,61$		
$\Sigma y^2 = 107\ 592,25$	$\Sigma y_s^2 = 54\ 696,50$			$\Sigma y_p^2 = 52\ 895,75$		
$\bar{x}$	$\bar{x}_s = -0,33$			$\bar{x}_p = -0,33$		
$\Sigma x^2 = 244$	$\Sigma x_s^2 = 122$			$\Sigma x_p^2 = 122$		
$\Sigma xy = 198,99$	$\Sigma xy_s = 108,16$			$\Sigma xy_p = 90,83$		
$N = 18$	$N_s = 9$			$N_p = 9$		
n_i : nombre de réponses par dose	3	3	3	3	3	3

Analyse de variance

Elle est conduite selon la méthode générale que nous avons appliquée à la diffusion en gélose.

Dans un premier temps on décompose la fluctuation totale due à toutes les mesures y en :

- somme des carrés due aux doses (6 doses)
- somme des carrés due à l'erreur expérimentale

Dans un deuxième temps la somme des carrés due aux 6 doses est à son tour décomposée en quatre sommes des carrés correspondant aux facteurs de variation suivants :

- différence entre les produits P (échantillon) et S (étalon)
- régression
- parallélisme des droites
- linéarité des régressions

1) Premier temps de l'analyse :

Calcul des sommes des carrés :

a) Fluctuation totale :

$$\sum y^2 - \frac{(\sum y_s + \sum y_p)^2}{N}$$

soit : $107\,592,25 - \frac{(1390,5)^2}{18} = 176,13$

le nombre de degrés de liberté est N - 1 = 17

b) Fluctuation entre les 6 doses :

$$\frac{(\sum y_i)^2}{n_i} - \frac{(\sum y_s + \sum y_p)^2}{N}$$

soit : $\frac{(221,5)^2}{3} + \frac{(234)^2}{3} + \ldots + \frac{(239)^2}{3} - \frac{(1390,5)^2}{18} = 171,45$

Le nombre de degrés de liberté est 6 - 1 = 5 (nombre de doses moins une)

c) Fluctuation relative à l'erreur expérimentale :

La somme des carrés et le nombre de degrés de liberté qui lui sont attachés sont obtenus par différence entre les résultats précédents.

Du tableau de l'analyse, ci-dessous, on déduit l'estimation de la variance résiduelle :

$$S^2 = \frac{\text{somme des carrés}}{\text{degrés de liberté}} = \frac{4,68}{12} = 0,39$$

Origine de la fluctuation	Somme des Carrés	d.l	Carré moyen (variance)
Entre doses	171,45	5	
Erreur expérimentale (ou résiduelle)	4,68	12	0,39
Totale	176,13	17	

d.l. : degrés de liberté

2) Deuxième temps de l'analyse :

On calcule la somme des carrés relative aux 4 facteurs :

a) Fluctuation relative aux produits S et P :

$$\frac{(\sum y_s)^2}{N_s} + \frac{(\sum y_p)^2}{N_p} - \frac{(\sum y)^2}{N}$$

soit : $\frac{(701)^2}{9} + \frac{(689,5)^2}{9} - \frac{(1390,5)^2}{18} = 7,35$

comme il y a deux produits, P et S, le nombre de degrés de liberté correspondant est 2 - 1 = 1

b) Fluctuation relative aux régressions :

$$\frac{(\sum xy_s + \sum xy_p)^2}{\sum x_s^2 + \sum x_p^2}$$

soit : $\frac{(198,99)^2}{244} = 162,28$

elle est toujours à 1 degré de liberté.

c) Fluctuation relative au paralléiisme des deux droites :

$$\frac{(\sum xy_s)^2}{\sum x_s^2} + \frac{(\sum xy_p)^2}{\sum x_p^2} - \frac{(\sum xy_s + \sum xy_p)^2}{\sum x_s^2 + \sum x_p^2}$$

soit :

$$\frac{(108,16)^2}{122} + \frac{(90,83)^2}{122} - \frac{(198,99)^2}{244} = 1,23$$

elle est toujours à 1 degré de liberté.

d) Fluctuation relative à la linéarité des deux régressions :
elle s'obtient par différence entre la somme des carrés de la fluctuaction "entre doses" du tableau précédant et les sommes des carrés des 3 fluctuations ci-dessus : produits, régression, parallélisme. Il en est de même pour les degrés de liberté.

Somme des carrés : 171,45 - (7,35 + 162,28 + 1,23) = 0,59
degrés de liberté : 5 - (1 + 1 + 1) = 2

Origine de la Fluctuation	Somme des Carrés	d.l	Estimation de variance
Entre produits	7,35	1	7,35
Régressions	162,28	1	162,28
Parallélisme	1,23	1	1,23
Linéarité	0,59	2	0,295
Entre doses	171,45	5	

Les estimations de variance obtenues dans le tableau ci-dessus sont confrontées à l'estimation de la variance résiduelle $s^2 = 0,39$, par une série de tests F :

Entre produits : $F^1_{12} = \frac{7,35}{0,39} = 18,8$ Significatif $P<0,01$

Régressions : $F^1_{12} = \frac{162,28}{0,39} = 416$ Hautement significatif

Parallélisme : $F^1_{12} = \frac{1,23}{0,39} = 3,15$ Non significatif

Linéarité : $F^2_{12} = \frac{0,295}{0,39} = 1$ Non significatif

La significativité est admise lorsque F calculé est supérieur à F tabulaire, pour une probabilité P fixée.
Les tables indiquent que $F^1_{12} = 4,75$ et $F^2_{12} = 3,88$ pour $P = 0,05$

Nous avons donc les résultats suivants :

- Le terme "régressions" est hautement significatif, traduisant l'existence d'une pente suffisante.
- Les deux droites sont parallèles et la relation log. doses - réponses est linéaire.
- La différence étalon-échantillon est significative, mais comme les autres termes ne le sont pas on peut conclure à la validité du titrage et calculer le titre de l'échantillon.

Activité Relative M_{ps}

L'activité relative M_{ps} de l'échantillon (P) par rapport à l'étalon (s) est égale à :

$$M_{ps} = \bar{x}_s - \bar{x}_p - \frac{\bar{y}_s - \bar{y}_p}{b}$$

formule dans laquelle :

$$\left.\begin{aligned}\bar{x}_s &= -0,33\\ \bar{y}_s &= 77,88\end{aligned}\right\}\ \text{étalon} \qquad \left.\begin{aligned}\bar{x}_p &= -0,33\\ y_p &= 76,61\end{aligned}\right\}\ \text{échantillon}$$

b est la pente commune des deux droites et a pour formule :

$$b = \frac{\Sigma xy_p + \Sigma xy_s}{\Sigma x_p^2 + \Sigma x_s^2}$$

$$b = \frac{198,99}{244} = 0,815$$

Le logarithme de l'activité relative est donc :

$$M_{ps} = -\frac{77,88 - 76,61}{0,815} = -1,558$$

En revenant aux unités d'origine, le logarithme de M_{ps} devient :

$$M_{ps} = -0,01558$$

dont l'antilogarithme est 0,96476

ce qui signifie que l'échantillon possède 0,96476 fois l'activité de l'étalon.

ou encore, en exprimant cette activité en pourcentages :

$$M_{ps} = 96,476\ \% \neq 96,5\ \%$$

Le titre de l'échantillon est donc égal à :

1 x 96,5 % = 0,965 g de chlorhydrate d'auréomycine pour 100 g de pommade.

Limites de confiance de M_{ps} : $M_{ps} \pm t\, s_{ps}$

La variance de M_{ps} est calculée par la formule approchée suivante, d'autant meilleure que la régression est plus marquée :

$$S_{ps}^2 = \frac{s^2}{b^2}\left[\frac{1}{N_p} + \frac{1}{N_s} + \frac{M_{ps} - (\bar{x}_s - \bar{x}_p)^2}{\Sigma x_2}\right]$$

dans laquelle S^2 désigne la variance résiduelle indiquée dans le premier tableau de l'analyse de variance.

$$S^2_{ps} = \frac{0,39}{(0,815)^2} \left[\frac{1}{9} + \frac{1}{9} + \frac{(-1,558)^2}{244} \right]$$

$$S^2_{ps} = 0,1362$$

L'écart-type S_{ps} est donc égal à :

$$S_{ps} = \sqrt{0,1362} = 0,369$$

Limites de confiance de M_{ps} : $\pm t\, S_M$

t étant égal à 2,18 pour 12 degrés de liberté (ceux de la variance de l'erreur expérimentale) et une probabilité P = 5 %, les limites sont :

$\pm$ 2,18 x 0,369

$\pm$ 0,804

ou, en revenant aux unités d'origine :

$\pm$ 0,00804

Si l'on exprime ces limites en pourcentage :

$2 \pm 0,00804$

soit 1,99196 et 2,00804, dont les antilogarithmes sont 98 166 et 101,868

Les limites de confiance du titre trouvé sont donc comprises entre 98,2 % et 101,9 %.

Dosage de l'Auréomycine

Turbidimétrie

Staphyloccus aureus ATCC 6538 P

Etalon :

Solution de chlorhydrate d'auréomycine titrant 1000 mcg/ml amenée, par dilution en eau distillée stérile aux concentrations :

0,02 - 0,04 - 0,06 - 0,08 - 0,010 mcg/ml

Echantillon

- Prise d'essai : 1 g de pommade
- Dissolution : éther de pétrole
- Extraction : eau distillée stérile (95 ml environ)
- Inhibition de la pénicilline : la solution est additionnée de 0,2 ml de solution de penicillinase et placée 1h30 à l'étuve à 37°C.
- Dilutions : après avoir complété au volume de 100 ml avec l'eau distillée, les dilutions sont effectuées, en eau distillée stérile, pour obtenir les concentrations théoriques :

0,04 - 0,06 - 0,08 mcg/ml

La dihydrostreptomycine présente ne gêne pas le dosage. Les dilutions finales dans les tubes de dosage sont :

étalon : 0,002 - 0,004 - 0,006 - 0,008 - 0,010 mcg/ml

échantillon : 0,004 - 0,006 - 0,008 mcg/ml.

Lecture des réponses y : opacités microbiennes

Les lectures, en pourcentage de lumière transmise, sont effectuées à la longueur d'onde de 530 mμ, le zéro de l'électrophotomètre (100 % L.T) étant établi avec le témoin bouillon non ensemencé.

Les résultats suivants ont été obtenus après 4 heures de bain-marie à 37°C.

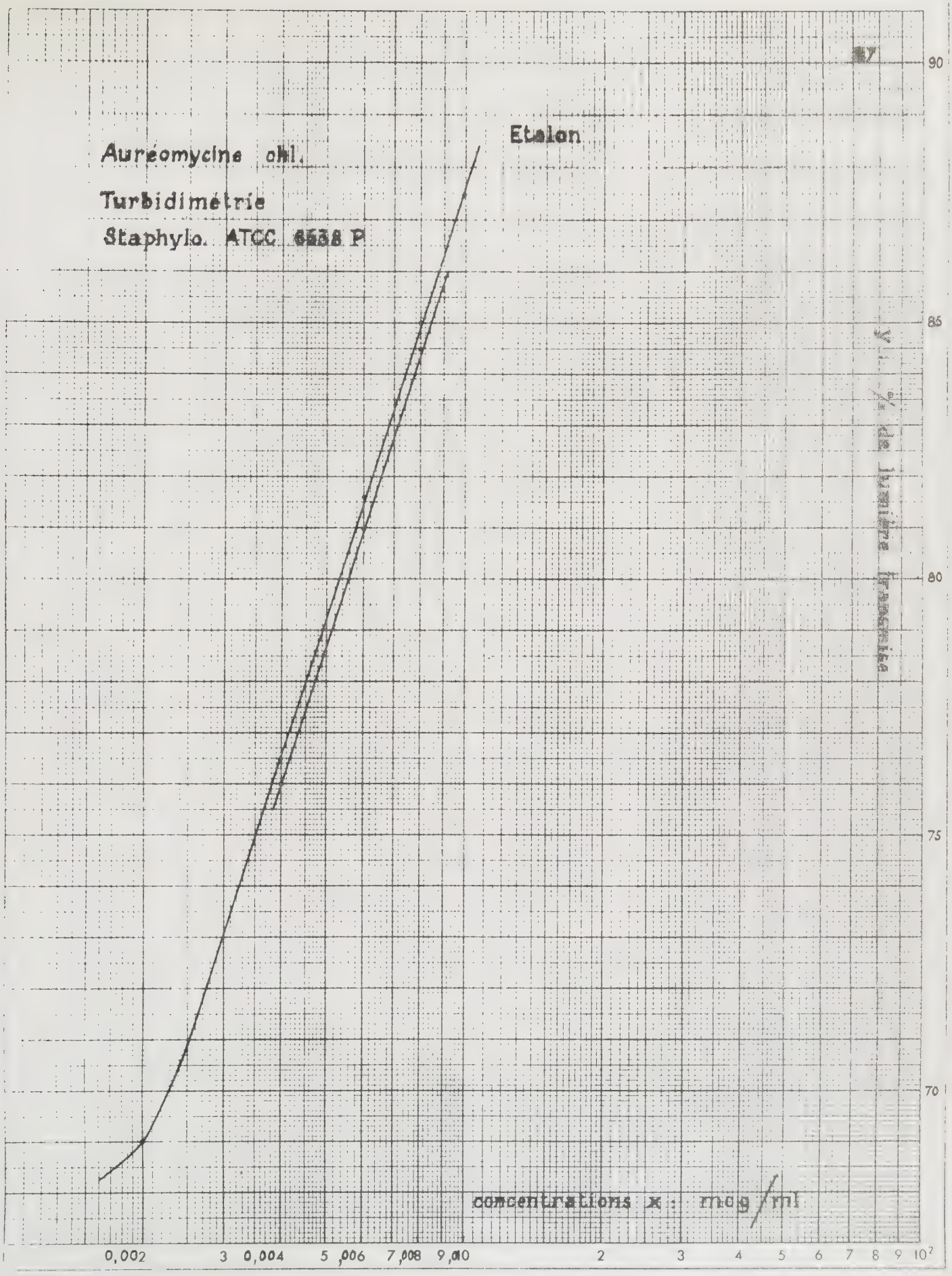
doses x : mcg/ml	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010	TG (*)
réponses y : % LT	69	76	81	85	87,5	62
	69	76	82	85	88,5	62
Etalon	69	77,5	82	85	86,5	62
Σ :	207	229,5		255	262,5	184
m :	69	76,5	81,6	85	87,5	62
Echantillon		76	81	84		
		76	80,5	85		
		76	81,5	84,5		
Σ :		228	243	253,5		
m :		76	81	84,5		

* TG = Témoin germe

Ainsi que nous l'avons déjà fait, lors du dosage de l'auréomycine par turbidimétrie avec staphylococcus IP 52 150, nous testons la validité de ce titrage par une analyse de variance dont nous résumons les principales étapes.

Cette analyse a été conduite à l'aide des logarithmes des concentrations 0,004 - 0,006 - 0,008 mcg/ml.

Ces chiffres étant peu facile à manier nous avons opéré sur les logarithmes transformés (multipliés par 100 et divisés par 6).


Etalon
Auréomycine chl.
Turbidimétrie
Staphylo. ATCC 6538 P
% de lumière transmise
90
85
80
75
70
concentrations x : mcg/ml
0,002
3
0,004
5
,006
7,008
9,010
2
3
4
5
6
7
8
9
10²

Calculs Préliminaires

	Etalon S			Echantillon P		
log. doses x (transformés)	- 3	0	+ 2	- 3	0	+ 2
réponses y	76	81	85	76	81	84
	76	82	85	76	80,5	85
	77,5	82	85	76	81,5	84,5
Σy_i	229,5	245	255	228	243	253,5
$\Sigma y = 1454$	$\Sigma y_s = 729,5$			$\Sigma y_p = 724,5$		
$(\Sigma y)^2 = 2\,114\,116$	$(\Sigma y_s)^2 = 532\,170,25$			$(\Sigma y_p)^2 = 524\,900,25$		
	$\bar{y}_s = 81,05$			$\bar{y}_p = 80,5$		
$\Sigma y^2 = 117\,675$	$\Sigma y_s^2 = 59\,242,25$			$\Sigma y_p^2 = 58\,432,75$		
	$\bar{x}_s = - 0,33$			$\bar{x}_p = - 0,33$		
$\Sigma x^2 = 76$	$\Sigma x_s^2 = 38$			$\Sigma x_p^2 = 38$		
$\Sigma xy = 129,16$	$\Sigma xy_s = 64,66$			$\Sigma xy_p = 64,50$		
$N = 18$	$N_s = 9$			$N_p = 9$		
n_i : nombre de réponses par dose	3	3	3	3	3	3

Analyse de variance

1) Première étape de l'analyse :

Calcul des sommes des carrés relatives à la variation totale et à la variation entre les 6 doses :

a) Fluctuation totale :

$$\Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N} = 117\,675 - \frac{(1454)^2}{18} = 224,12$$

nombre de degrés de liberté : N - 1 = 17

b) Fluctuation entre les doses :

$$\frac{(\Sigma y_i)^2}{n_i} - \frac{(\Sigma y)^2}{N}$$

$$\frac{(229,5)^2}{3} + \frac{(245)^2}{3} + \ldots + \frac{(253,5)^2}{3} - \frac{(1454)^2}{18} = 220,95$$

nombre de degrés de liberté : 6 - 1 = 5

c) Fluctuation due à l'erreur expérimentale :

elle est obtenue par différence entre les 2 sommes de carrés précédentes

$$224,12 - 220,95 = 3,17$$

nombre de degrés de liberté : 17 - 5 = 12

D'où l'estimation de la variance résiduelle :

$$S^2 = \frac{3,17}{12} = 0,264$$

Origine de la variation	Somme des Carrés	d.l	Carré moyen (variance)
Entre doses	220,95	5	
Erreur experim.	3,17	12	0,264
Totale	224,12	17	

2) Deuxième étape de l'analyse :

La somme des carrés relative aux variations entre doses est décomposée à son tour en quatre sommes de carrés comprenant les sources de variations suivantes : "entre produits" (étalon et échantillon), parallélisme, régression et linéarité des droites.

a) Somme des carrés relative à P et S (échantillon et étalon) :

$$\frac{(\sum y_s)^2}{N_s} + \frac{(\sum y_p)^2}{N_p} - \frac{(\sum y)^2}{N}$$

$$\frac{(729,5)^2}{9} + \frac{(724,5)^2}{9} - \frac{(1454)^2}{18} = 1,397$$

nombre de degrés de liberté : 2 - 1 = 1

b) Somme des carrés relative aux régressions :

$$\frac{(\sum xy)^2}{\sum x^2} = \frac{(129,16)^2}{76} = 219,504$$

nombre de degrés de liberté = 1

c) Somme des carrés relative au parallélisme :

$$\frac{(\sum xy_s)^2}{\sum x_s^2} + \frac{(\sum xy_p)^2}{\sum x_p^2} - \frac{(\sum xy)^2}{\sum x^2}$$

$$= \frac{(64,66)^2}{38} + \frac{(64,5)^2}{38} - 219,504 = 0$$

nombre de degrés de liberté = 1

d) Somme des carrés relative à la linéarité :

elle est obtenue par différence entre la somme des carrés "entre doses" et les trois sommes des carrés que nous venons de calculer :

$$220,95 - (1,397 + 0 + 219,504) = 0,049$$

nombre de degrés de liberté : 2

Origine de la variation	d.l	Somme des Carrés	Carré moyen (variance)	F P = 0,05
Entre produits	1	1,397	1,397	5,29 *
Régression	1	219,50	219,504	831,4 * *
Parallélisme	1	0	0	0 N.S
Linéarité	2	0,049	0,024	1 N.S
Entre doses	5	220,95	44,19	167 * *

Résultats :

Le terme "régression" est hautement significatif, traduisant donc l'existence d'une pente suffisante. Les deux droites sont parallèles et doivent être considérées comme linéaires.

La différence entre l'étalon et l'échantillon est significative pour P = 0,05, mais elle ne l'est pas pour P = 0,01. La différence est donc peu marquée.

Le dosage est considéré comme valide et le titre de l'échantillon est calculé :

Activité relative M_{ps}

$$M_{ps} = \bar{x}_s - \bar{x}_p = \frac{\bar{y}_s - \bar{y}_p}{b}$$

nous avons :

$\bar{x}_s = -0,33$; $\bar{y}_s = 81,05$ étalon

$\bar{x}_p = -0,33$; $\bar{y}_p = 80,5$ échantillon

b, pente commune des deux droites est donné par la formule :

$$b = \frac{\Sigma xy}{\Sigma x_2} = \frac{129,16}{76} = 1,699$$

$$M_{ps} = -\frac{81,05 - 80,50}{1,699} = -0,323$$

En revenant aux unités d'origine, le logarithme de l'activité relative devient :

$$M_{ps} = - \frac{0,323 \times 6}{100} = - 0,0192$$

dont l'antilogarithme est 0,956725 ≠ 0,957. L'échantillon possède donc 0,957 fois l'activité de l'étalon, ou encore, en exprimant cette activité en pourcentage : le titre de l'échantillon est 95,7 % par rapport à l'étalon.

Le titre est donc égal à :

1 x 0,957 = 0,957 g d'auréomycine chlorhydrate pour 100 g de pommade.

Limites de confiance de M_{ps} : $M_{ps} \pm t\, S_{ps}$

- Calcul de la variance de M_{ps} :

$$S^2_{ps} = \frac{S^2}{b^2} \left[\frac{1}{N_s} + \frac{1}{N_p} + \frac{(M_{ps} - (\bar{x}_s + \bar{x}_p)^2}{\sum x^2} \right]$$

formule dans laquelle S^2 est la valeur de la variance résiduelle : 0,264

$$S^2_{ps} = \frac{0,264}{(1,699)^2} \left[\frac{1}{9} + \frac{1}{9} + \frac{(- 0,323)^2}{76} \right]$$

$$S^2_{ps} = 0,0203$$

- Ecart-type de M_{ps} :

$$S_{ps} = \sqrt{0,0203} = 0,142$$

Limites de confiance de M_{ps} : $\pm t\, S_M$

t étant égal à 2,18 pour 12 degrés de liberté (ceux de la variance résiduelle) et P = 0,05, nous avons les limites :

$\pm$ 2,18 x 0,142

$\pm$ 0,309

ou, en revenant aux unités d'origine :

$$\frac{0,309 \times 6}{100} = 0,01854, \text{ donc } \pm 0,01854$$

Si l'on exprime ces limites en pourcentage :

$2 \pm 0,01854$

soit 1,98146 et 2,01854 dont les antilogarithmes sont 95,82 et 104,362

Les limites de confiance du titre trouvé sont comprises entre 95,8 % et 104,4 %

Comparaison des résultats obtenus
par les deux méthodes de titrage de l'Auréomycine.

	Titre Trouvé M	Limites de confiance de M
Turbidimétrie Staphylo. IP 52 150	96,50 %	93,2 - 101,9 %
Turbidimétrie Staphylo. ATCC 6538 P	95,70 %	95,8 - 104,4 %

Les titres trouvés par ces techniques effectuées en turbidimétrie sont entièrement comparables.

VI - CONCLUSION

Lorsque l'association triantibiotique, pénicilline, auréomycine, dihydrostreptomycine, nous a été proposée, nous nous sommes trouvée devant un problème complexe : la plupart des souches de collection dont nous disposions présentant des sensibilités voisines aux trois antibiotiques et le titrage de la pénicilline se révélant impossible par les méthodes microbiologiques usuelles.

Ces difficultés nous ont conduit à établir un processus de recherche basé sur les propriétés physico-chimiques des antibiotiques et sur leurs propriétés biologiques. Ces dernières ont été mises en évidence par leurs seuils de sensibilité et d'interférence vis-à-vis de nos souches microbiennes.

En nous guidant sur ces propriétés et sur le rapport des concentrations des antibiotiques dans la formule du produit, nous avons pu, à l'appui d'expériences préliminaires, suggérer un certain nombre de méthodes conduisant au titrage des antibiotiques et basées sur :

- la séparation à l'aide de solvants sélectifs,
- l'utilisation d'inhibiteurs chimiques ou biologiques,
- la mise en jeu d'une souche bactérienne classique présentant une sécurité suffisante,
- l'emploi d'une souche bactérienne ayant acquis une résistance élevée vis-à-vis de l'un ou des deux autres antibiotiques interférant.

Parmi les méthodes envisagées nous proposons, au vu de nos résultats, de retenir les méthodes suivantes :

Dosage de la pénicilline par diffusion en gélose avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, en présence d'ions magnésium à une concentration comprise entre 1,2 et 2,4 mg/ml dans le milieu gélose, quantité suffisante pour inhiber l'auréomycine présente.

Dosage de la dihydrostreptomycine par l'une des deux méthodes de diffusion en gélose suivantes :

- soit avec Bacillus subtilis ATCC 6633 après séparation de l'auréomycine à l'aide d'un solvant sélectif et inhibition de la pénicilline,
- soit avec une souche microbienne, Staphylococcus 'Delarue", résistante aux deux autres antibiotiques.

Dosage de l'auréomycine par l'une des deux méthodes :

- soit turbidimétrie avec Staphylococcus aureus ATCC 6538 P, en présence de dihydrostreptomycine qui ne produit aucune interférence, mais après neutralisation de la pénicilline.
- soit turbidimétrie avec Staphylococcus IP 52 150, résistant à la dihydrostreptomycine, et après neutralisation de la pénicilline.

VII - ANNEXE
TECHNIQUES DES TITRAGES MICROBIOLOGIQUES
MATERIEL ET APPAREILLAGE

Matériel et appareillage

Diffusion en gélose :

- Boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre intérieur, à fond très plat, type "Anumbra"
  ou boîte en matière plastique de même diamètre.
- Disques filtrants de 9 mm de diamètre
  Diatrose XL 1 - 10, la Rochette-Cenpa.
- Aiguilles à dissection, pour la pose des disques.
- Lecteur des zones d'inhibition : Appareil "Fisher - Lilly Antibiotic zone Reader"

Turbidimétrie :

- Tubes à essai en verre pyrex de 16 x 160 mm.
- Appareil répartiteur en verre pyrex, capacité 1 litre, jaugé à 9 ml (répartition du bouillon inoculé dans les tubes à essai)
- Bain-marie avec thermostat et thermomètre de contrôle, muni d'un agitateur assurant une répartition homogène de la chaleur.
- Electrophotocolorimétre Lumetron 402 E équipé de filtres B 530, B 550 et B 650 et accessoires pour lectures en opacimétrie - Tubes de lecture munis d'une tubulure latérale pour vidange automatique. Echelle de lecture graduée en pourcentages de lumière transmise.

Technique de dosage de la
Pénicilline G sodique

Diffusion en gélose
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

Milieux de dosage :

- Gélose de base pH 6,6 :

  Antibiotic medium 2 - Bacto-Penassay Base Agar.
  Difco, Référence 0270 - 02
  emploi : 21 ml par boîte de Pétri.

- Gélose de surface ou d'ensemencement pH 6,6 :

  Antibiotic medium 1 - Bacto-Penassay Seed Agar.
  Difco, Référence 0263 - 02
  emploi : 4 ml par boîte de Pétri.

Solution tampon pH 6 :

K_2HPO_4 anh.	1,3 g
KH_2PO_4 anh.	8,7 g
eau dist. Q.S.P.	1000 ml

- stérilisation : 30 min. à 120°C
- emploi : préparation des solutions mères et des dilutions antibiotiques.

Etalon :

Benzylpenicillinate de sodium : conservé en ampoules scellées, à + 4°C.

- Solution mère : préparée en tampon pH 6, titre : 1000 U/ml - conservation 4 jours à + 4°C.
- dilutions : à l'aide du tampon pH 6 pour obtenir 0,5 - 1 - 2 U/ml.

Echantillon :

Il est amené par dilution en tampon pH 6 aux concentrations théoriques : 0,5 - 1 - 2 U/ml.

Germe-test :

- En vue du dosage : culture sur gélose inclinée de formule :

extrait de viande	5 g
chlorure de sodium	5 g
peptone bactériologique	15 g
agar	15 g
eau dist. Q.S.P.	1000 ml

pH final : 7

incubation 18 heures à 37°C.

- Suspension : les cultures de 18 heures sont recueillies à l'aide d'eau distillée stérile, 2 ml environ par tube.
La suspension dense de germes peut être conservée 1 semaine à 4°C.

- Inoculum : à partir de la suspension dense de germes, préparer une suspension en eau distillée stérile que l'on ajuste à 40 % de lumière transmise par rapport à l'eau distillée, à 650 mμ de longueur d'onde, en cuves de 1 cm.
La gélose de surface est ensemencée à raison de 1,5 % avec cette suspension.

Répartition en boîtes de Pétri :

- 9 boîtes de Pétri par échantillon à titrer.
- Disques de papier-filtre imprégnés avec les différentes dilutions antibiotiques et disposés sur la gélose selon le modèle décrit par la Pharmacopée française, 1965, page 1605.

Incubation :

16 - 18 heures à l'étuve à 37°C.

Technique de dosage de la
Pénicilline G sodique

Turbidimétrie
Staphylococcus aureus 101

Milieu de dosage :

Bouillon pH 7 : formule de la Pharmacopée française, 1965 n° XII p. 1613

Tampon pH 6 :

K_2HPO_4 anh.	1,3 g
KH_2PO_4 anh.	8,7 g
eau dist. Q.S.P.	1000 ml

- stérilisation : 30 minutes à 120°C.
- emploi : préparation des solutions mères et dilutions de la pénicilline.

Etalon :

- Solution mère : 1000 U/ml en tampon pH 6.
- Dilutions : en tampon pH 6 pour obtenir les concentrations :
  0,07 - 0,10 - 0,15 - 0,20 - 0,25 - 0,35 U/ml

Echantillon :

dilutions en tampon pH 6 pour obtenir les concentrations :
0,15 - 0,20 - 0,25 U/ml.

Germe-test :

- Entretien sur gélose ordinaire inclinée (dont la formule est indiquée au titrage de la pénicilline par diffusion).
- En vue du dosage : culture sur gélose inclinée, 18 heures à 37°C.
- Préparation d'une suspension microbienne en eau distillée stérile

donnant 40 % de lumière transmise à 550 mμ, en cuve de 1 cm.

- Ensemencement dans le bouillon de dosage : 2 %

Préparation des tubes de dosage :

- Etalon : - 4 tubes par dilution, sauf le point de référence de la gamme (0,020 U/ml) pour lequel on dispose 6 tubes.
- Echantillon : 3 tubes par dilution.
- Témoins : Témoins "germe" : 6 tubes
  témoins bouillon : 6 tubes
  les tubes témoins bouillon reçoivent III gouttes de formaldéhyde.
- Distribution du bouillon ensemencé : 9 ml par tube.

Incubation au bain-marie à 37° : 4 heures environ.

- Surveillance du développement microbien dans les tubes témoins "germe" et point de référence de la gamme. Une série complète de tubes de la gamme étalon est retirée du bain-marie. Cette première lecture permet d'évaluer la pente de la droite.
- Lorsque le développement est jugé suffisant les tubes sont retirés du bain-marie. On ajoute III gouttes de formaldéhyde dans tous les tubes, sauf dans les tubes témoins bouillon.
- Les tubes sont agités par retournement et laissés au repos 15 minutes.

Lecture des opacités microbiennes :

Lecture à 530 mμ par rapport à un témoin bouillon servant à établir 100 % de lumière transmise.

Technique de titrage de la

Dihydrostreptomycine

Diffusion en gélose

Staphylocoque "Delarue"

Milieux de dosage :

- Gélose de base pH 7,8 - 8 : Antibiotic Medium 5
  Difco, Réf. 0277-02.
  21 ml par boîte de Pétri.
- Gélose de surface pH 7,8 - 8 : Antibiotic medium 5
  Difco, Réf. 0277 - 02
  4 ml par boîte de Pétri.

Tampon pH 8 :

K_2HPO_4 anh.	16,7 g
KH_2PO_4 anh.	0,5 g
eau dist. Q.S.P.	1000 ml

- stérilisation 30 min. à 120°.
- emploi : préparation des dilutions antibiotiques.

Etalon :

- Sulfate de dihydrostreptomycine : titre exprimé en mcg de dihydrostreptomycine base par mg.
- Solution mère : 1000 mcg/ml, préparée en eau distillée stérile. conservation : 1 mois à + 4°C.
- Dilutions en tampon pH 8 pour obtenir les concentrations 5 - 10 - 20 mcg/ml.

Echantillon :

dilué en tampon pH 8 pour obtenir les concentrations théoriques : 5 - 10 - 20 mcg/ml.

Germe-test :

- En vue du dosage, le germe-test est ensemencé deux jours de suite sur gélose inclinée (dont la formule est indiquée au titrage de la Pénicilline).

  Culture : 18 h à 37°C.
- Les cultures sont recueillies en eau distillée stérile et par dilution en eau distillée on prépare une suspension donnant 40 % de lumière transmise, à 650 mμ, par rapport à l'eau distillée, en cuves de 1 cm.
- La gélose de surface est ensemencée à raison de 1 %

Répartition en boîtes de Pétri :

- 9 boîtes de Pétri par échantillon à titrer.
- Prédiffusion : 1 heure
- 16 - 18 heures d'étuve à 37°C.

Technique de Titrage de la Dihydrostreptomycine

Diffusion en gélose

Bacillus subtilis ATCC 6633

Milieux de dosage :

- Gélose de base pH 7,8 - 8 : 21 ml par boîte de Pétri
  Difco 5, Réf. 0277 - 02
- Gélose de surface : 4 ml par boîte.
  Difco 5

Tampon pH 8 :

K_2HPO_4 anh.	16,7 g
KH_2PO_4 anh.	0,5 g
eau dist. Q.S.P.	1000 ml

- Stérilisation 30 min. à 120°C
- Emploi : préparation des dilutions des antibiotiques.

Etalon :

- Sulfate de dihydrostreptomycine : titre exprimé en mcg de dihydrostreptomycine base par mg.
  conservé en ampoules scellées à + 4°C.
- Solution mère : 1000 mcg/ml, préparée en eau distillée stérile.
  conservation : 1 mois à + 4°C.
- Dilutions en tampon pH 8 pour obtenir les concentrations : 1 - 2 - 4 mcg/ml.

Echantillon :

- Dilutions en tampon pH 8, pour obtenir 1 - 2 - 4 mcg/ml.

Germe-test :

- Entretien sur gélose ordinaire inclinée (dont la formule est indiquée au titrage de la pénicilline) ; culture : 18 h à 37°C.

- Préparation des spores :
  - A partir d'une culture de 18 heures sur gélose inclinée, recueillie à l'aide de 2 - 3 ml d'eau distillée ensemencer une boîte de Roux contenant environ 300 ml de milieu Difco 1 (Référence 0263 - 02).
  - Incuber 7 jours à 37°C.
  - Recueillir la culture à l'aide de 50 - 60 ml d'eau distillée stérile en utilisant des billes de verre.
  - La suspension est chauffée 30 minutes à 65°C, pendant 3 jours de suite.
  - Conservation : 2 mois à 4°C.
- Préparation de l'inoculum :

  La suspension concentrée de spores est diluée en eau distillée stérile, pour obtenir 15 % de lumière transmise à 650 mμ, en cuve de 1 cm.

  Inoculum : 0,5 % dans la gélose de surface.

Répartition en boîtes de Pétri :

- 9 boîtes de Pétri par échantillon à titrer.
- Incubation : 18 h à l'étuve à 37°C.

Technique du Titrage de
l'Auréomycine
Turbidimétrie
Staphylococcus aureus I.P 52 150

Milieu de dosage :

Bouillon . Antibiotic medium 3, Difco Référence 0243 - 02 pH 7.

Solution tampon pH 6 :

K_2HPO_4 anh.	1,3 g
KH_2PO_4 anh.	8,7 g
eau dist. Q.S.P.	1000 ml

- Stérilisation : 30 min. à 120°C.
- Emploi : dilutions des antibiotiques.

Etalon :

- Chlorhydrate d'auréomycine, conservé en ampoules scellées à + 4°.
- Solution mère : 1000 mcg/ml, en eau distillée stérile.
- Dilutions : en tampon pH 6 pour obtenir les concentrations :
  0,04 - 0,06 - 0,08 - 0,10 - 0,12 - 0,14 mcg/ml.

Echantillon :

- Dilutions en tampon pH 6 pour obtenir : 0,08 - 0,10 - 0,12 mcg/ml.

Germe-test :

- Entretien sur gélose inclinée ordinaire (dont la formule est indiquée au titrage de la pénicilline), culture : 18 heures à 37°C.
- En vue du dosage : ensemencement sur gélose inclinée et culture 18 heures à 37°C.

- Préparation de l'inoculum :

  recueillir la culture de 18 heures en eau distillée stérile et diluer de façon à obtenir 75 % de lumière transmise à 650 mμ, en cuve de 1 cm.

- Inoculer le bouillon à raison de 4 % avec cette suspension.

Préparation des tubes de titrage :

- Les solutions sont réparties sous le volume de 1 ml dans tous les tubes :
  - 3 tubes par concentration échantillon
  - 4 tubes par concentration étalon sauf le point référence de la gamme (0,010 mcg/ml) pour lequel on dispose 6 tubes.
  - 6 tubes témoins germe sans antibiotiques et 6 tubes témoins bouillon recevant trois gouttes de formaldéhyde. Les tubes témoins reçoivent 1 ml de solution tampon pH 6.
- Répartition du bouillon ensemencé : 9 ml par tube.

Bain-marie à 37°C :

Le développement microbien est suivi en évaluant l'opacité d'un tube témoin germe et d'un tube correspondant au point de référence de la gamme étalon à 530 mμ.

Une série complète des tubes de la gamme étalon est finalement retirée afin de juger la valeur de la pente du titrage.

Incubation : 4 heures environ.

Lecture des opacités microbiennes :

Tous les tubes reçoivent III gouttes de formaldéhyde, et sont agités.

Lecture à 530 mμ, le zéro du photomètre étant ajusté à l'aide du témoin bouillon.

Technique de Titrage de
l'Auréomycine

Turbidimétrie
Staphylococcus aureus ATCC 6538 P

Milieu de titrage :

Bouillon : Antibiotic medium 3, Difco Référence 0243 - 02 pH 7.

Etalon :

- Chlorhydrate d'auréomycine, conservé en ampoules scellées à + 4°C
- Solution mère : 1000 mcg/ml en eau distillée stérile.
- Dilutions : en eau distillée stérile pour obtenir les concentrations : 0,02 - 0,04 - 0,06 - 0,08 - 0,10 mcg/ml.

Echantillon :

Dilutions en eau distillée stérile pour obtenir les concentrations théoriques : 0,04 - 0,06 - 0,08 mcg/ml.

Germe-test :

- Entretien sur gélose ordinaire inclinée (dont la formule est indiquée au titrage de la pénicilline).
  culture de 18 heures à 37°C.
- En vue du titrage : culture de 18 heures à 37°C.
- Préparation de l'inoculum :
  recueillir la culture de 18 heures sur gélose inclinée et l'amener par dilution en eau distillée stérile à 40 % de lumière transmise, à 550 mμ, en cuve de 1 cm.
- Inoculer le bouillon de dosage à raison de 3 %.

Préparation des tubes de dosage :

- 3 tubes pour chaque concentration échantillon.
  4 tubes pour chaque concentration étalon, sauf le point de référence (0,006 mcg/ml) : 6 tubes.

- 6 tubes témoins bouillon.
- 6 tubes témoins germe.
- Les solutions antibiotiques sont réparties sous le volume de 1 ml ; les tubes témoins reçoivent 1 ml d'eau distillée stérile, et les témoins bouillon III gouttes de formaldéhyde.
- Répartition du bouillon ensemencé : 9 ml par tube.

Incubation au bain-marie à 37°C :

- Surveillance du développement microbien dans les tubes témoins germe et les tubes point de référence de la gamme étalon.
  La valeur de la pente est jugée sur la lecture d'une série de tube de la gamme étalon.
- Durée de l'incubation : 4 heures environ.

Lecture des opacités microbiennes :

- Tous les tubes reçoivent III gouttes de formaldéhyde, sauf les tubes témoins bouillon.
- Après agitation par retournement des tubes, ceux-ci sont laissés au repos 15 minutes.
- Lecture à 530 mμ, le zéro du photomètre (100 % L.T.) étant établi à l'aide d'un témoin bouillon.

VIII – BIBLIOGRAPHIE

1 - Antibiotiques, Extraits de Thérapie 1954, 1955, 1956, 1958, 1959.
(G. Doin et Cie, Ed. Paris).

2 - ARRET B., WOODARD M.R., WINTERMERE D.M., KIRSCHBAUM A.,
Antibiotic interference tresholds of microbial assays.
Antibiotics and Chemotherapy, 1957, 7, 545 - 548.

3 - ARRET B.
New developments in antibiotic interference thresholds of microbial assays. J. pharm. Sci., 1968, 57, 871 - 874

4 - BENBOUGH J.E., MORRISSON G.A.
Bacteriostatic action of some tetracyclines.
J. Pharm. Pharmacol., 1965, 17, 409 - 422.

5 - BENBOUGH J.E., MORRISSON G.A.
The molecular basis of an inhibition by tetracyclines.
J. gen. Microbiol., 1967, 49, 469 - 485.

6 - BERNARD J. et LAMBIN S.
Du choix des peptones utilisables en bactériologie.
Ann. pharm. franç., 1961, 19, 557 - 579 et 678 - 696.

7 - BOEHM E.E.
Synergism in vitro of certain antimicrobial agents.
J. Soc. Cosmetic chemists, 1968, 19, 531 - 549.

8 - BORY J., DESVIGNES A., JUND Y.
Mécanisme d'action des médicaments antibactériens.
Prod. et Probl. Pharm., 1963, 18, 413 - 418.

9 - BRODY T.M., HURWITZ R., BAIN J.A.
Magnesium and the effect of the tetracycline antibiotics on oxidative processes in mitochondria.
Antibiotics and Chemotherapy, 1954, 4, 864 - 870.

10 - CHANG T.W., WEINSTEIN L.
Inhibitory effects of other antibiotics on bacterial morphologic changes induced by penicillin G.
Nature, Lond., 1966, 211, 763 - 765.

11 - CHABBERT Y.,
Action des associations d'antibiotiques sur les germes aérobies.
Ann. Inst. Pasteur, 1953, 84, 545 - 561.

12 - CHABBERT Y.
Technique simplifiée pour l'étude de l'action des associations d'antibiotiques.
Ann. Inst. Pasteur, 1953, 85, 122 - 125.

13 - CHABBERT Y.
Une technique nouvelle d'étude de l'action bactéricide des associations d'antibiotiques : le transfert sur cellophane.
Ann. Inst. Pasteur, 1957, 93, 289 - 299.

14 - CHABBERT Y.
L'antibiogramme. (Ed. de la Tourelle, 1963).

15 - CHASSAGNE P., GEORGES-JANET L., DEVEAUX J.P.
Les antibiotiques et leurs usages thérapeutiques, (Maloine, 1967).

16 - CLUZEL R.
De l'instabilité du chloramphénicol en milieu aqueux.
Pathol. Biol., 1965, 13, 392 - 394.

17 - COOPER P.D.
Site of action of radio penicillin,
Bact. rev., 1956, 20, 28.

18 - DESBORDES J., NINARD B.
Problèmes posés par la sélection des produits azotés dégradés (peptones, protéolysats, etc.) destinés à la préparation des milieux de culture microbiologique.
Prod. et Probl. Pharm., 1962, 17, 433 - 451.

19 - DESVIGNES A.
Titrage des antibiotiques dans les préparations galéniques.
Conf. Soc. Techn. Pharm., 1958.

20 - EVANS R.M.
The chemistry of the antibiotics used in medicine.
(Pergamon Press, 1965).

21 - FINN R.K.
Theory of agar diffusion methods for bioassay.
Anal. Chem., 1959, 31, 975 - 977.

22 - FURESZ S., ZANGAGLIA D., SCOTTI R.
The effect of fixed combinations of antibiotics on staphylococci in vitro.
Antibiotics and Chemotherapy, 1958, 8, 571 - 575.

23 GARRETT E.R.
Classification and evaluation of combined antibiotic activity.
Antibiotics and Chemotherapy, 1958, 8, 8 - 20.

24 - GOTTLIEB D.
Antibiotics and cell metabolism.
Hind. Antibiotics Bull., 1967, 10, 123 - 134.

25 - GROVE D.C., RANDALL W.A.
Assay methods of antibiotics. (Medical Encyclopedia, 1955).

26 - HAGEMAN J., Antibiotiques. (Weinheim, J. Cramer, 1963).

27 - HAMILTON-MILLER J.M.T., SMITH J.T., KNOX R.
Penicillins, J. Pharm. Pharmacol., 1963, 15, 81 -

28 HARCOURT R.S., HAMBURGER M.
The effect of magnesium sulfate in lowering tetracycline blood levels.
J. Lab. clin. Med., 1957, 50, 464 - 468.

29 - JAWETZ E., GUNNISSON J.B.
Studies on antibiotic synergism and antagonism : a scheme of combined antibiotic action.
Antibiotics and Chemotherapy, 1952, 2, 243 - 248.

30 - JONES J.G., MORRISSON G.A.
The bacteriostatic actions of tetracycline and oxytetracycline.
J. Pharm. Pharmacol., 1962, 14, 808 - 824.

31 - KAPLAN M.A., LANNON J.H., BUCKWALTER F.H.
Inactivation of tetracycline with sodium borohydride.
Appl. Microbiol., 1965, 13, 505.

32 - KAVANAGH F.
Analytical Microbiology. (Academic Press, 1963).

33 - KOHN K.W.
Mediation of divalent metal ions in the binding of tetracycline to macromolecules.
Nature, 1961, 191, 1156 - 1158.

34 - LELUAN G., PRASARD M.
Mécanisme d'action des substances antibiotiques.
Bull. Chim. thérap., 1968, n° 3, 227 - 234

35 - LYNN B.
Antibacterial action of the penicillins. Penicillin's effect on bacterial cell walls.
Pharm. J., 1968, 201, 307 - 312.

36 - MARTIN R., CHABBERT Y., SUREAU B.
Les associations d'antibiotiques. Etude et valeur de leurs pouvoirs bactériostatique et bactéricide.
Presse méd., 1953, n° 9, 168 - 171.

37 - MOUTON R.P., KOELMAN A.
Bacteriostatic and bactericidal action of combined antibacterial agents in vitro.
Antimicrob. Agents chemother., 1965, 261 - 266

38 - NEUMAN M.
Vade Mecum des antibiotiques. (Maloine 1962).

39 - OSKAM H.J., KOELMAN A.
Recherche sur l'antagonisme d'une part et le renforcement d'activité d'autre part de quelques antibiotiques combinés par paire.
Ann. Inst. Pasteur, 1959, 96, 372 - 375.

40 - PAREDES L., DE PLABO J.
Synergistic action in vitro of tetracycline and benzylpenicillin.
Antimicrob. Agents chemotherap., 1962, 794 - 800.

41 - PATTE J.C., HIRSCHE H., CHABBERT Y.
Etude des courbes d'effet bactériostatique des associations d'antibiotiques.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 621 - 635.

42 - PHILIPPE J.
Les méthodes statistiques en pharmacie et en chimie.
(Masson, 1967).

43 - PLOTZ P.H., DAVIS B.D.
Synergism between streptomycin and penicillin. A proposed mecanism.
Science, 1962, 135, 1067 - 1068.

44 - PRICE K.E., ZOLLI Z., ATKINSON J.C., LUTHER H.G.
Antibiotic inhibitors : I The effect of certain milk constituents, II Studies on the inhibitory action of selected divalent cations for oxytetracycline.
Antibiotics and Chemotherapy, 1957, 7, 672 - 701.

45 - ROKOS J., BURGER M., PROCHAZKA P.
Effect of calcium ions on the inhibition of hydrolases by chlortetracycline.
Nature 1958, 181, 1201 - 1202.

46 - ROKOS J., MALEK P., BURGER M., PROCHAZKA P., KOLC J.
The effect of divalent metals on the inhibition of pancreatic lipase by chlortetracycline.
Antibiotics and Chemotherapy, 1959, 9, 600 - 608.

47 - ROUX J., OBERTI J.
Effets des associations d'antibiotiques sur la pénétration intracellulaire de la chlortetracycline.
Path. - Biol., 1971, 19, 599 - 605.

48 - SCHWARTZ D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes.
(Flammarion, 1963).

49 - SELIGMAN S.J., HEWITT W.L.
Interaction of penicillin and tetracycline as a function of time.
Antimicrob. Agents chemother., 1963, 406 - 410.

50 - STROMINGER J.L., TIPPER D.J.
Bacterial cell wall synthesis and structure in relation to the mecanism of action of penicillins and other antibacterial agents.
Amer. J. Med., 1965, 39, 708.

51 - VIDEAU D.
Sur le mode d'action des antibiotiques.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 709.

52 - VIDEAU D.
Pénétration, site et mode d'action des antibiotiques chez la bactérie.
Biol. méd., 1968, 57, 449 - 470.

53 - WARREN G.H., GRAY J.
Effects of the interaction of penicillins with other antimicrobial agents on the enzymic lysis of Staphylococcus aureus.
Soc. exper. Biol. Med., 1968, 128, 776 - 781.

54 - WATERMAN N.G., FRANKLIN S., DANZIGER B.S., ABRAMS B.L.
The effects of temperature on the sensitivity of staphylococcus to different antibiotics.
Surg. Gynec. Obstet., 1967, 124, 262 - 268.

55 - WEISS P.J., ANDREW M.L., WRIGHT W.W.
Solubility of antibiotics in twenty-four solvents.
I Antibiotics and Chemotherapy, 1957, 7, 374 - 377
II Antibiotics and Chemotherapy, 1959, 9, 277 - 279.

56 - WEISBLUM B., DAVIES J.
Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome.
Bact. Rev., 1968, 32, 493 - 528.

57 - WEINBERG E.D.
The influence of inorganic salts on the activity in vitro of oxytetracycline.
Antibiotics and Chemotherapy, 1954, 4, 35 - 42.

58 - WEINBERG E.D.
The mutual effects of antimicrobial compounds and metallic cations.
Bact. Rev., 1957, 21, 46 - 68.

59 - WEINBERG E.D.
Antibiotic sensitivity of bacteria grown in peptones with a variable content of metallic ions.
Amer. J. clin. Path., 1958, 30, n° 4.

60 - WEINBERG E.D.
Enhancement of bacitracin by the metallic ions of group II B.
Antibiot. Ann., 1958 - 1959, 924 - 929.

61 - WEINBERG E.D.
Known and suspected role of metal coordination in actions of antimicrobial drugs.
Fed. Proc., 1961, 20, 132 - 135.

62 - ZOLLI Z., PRICE K.E., CHICHESTER D.F.
Antibiotic inhibitors. The effect of multivalent metallic cations on intestinal absorption and in vitro antibacterial activity of oxytetracline.
Antimicrob. Agents chemother., 1960, 292 - 295.

TABLE DES MATIERES

	Pages
I - INTRODUCTION	1
II - BASES THEORIQUES DES TITRAGES MICROBIOLOGIQUES	5
III - CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES ANTIBIOTIQUES ASSOCIES	10
A/ Les divers effets des associations.	11
B/ Moyens de remédier aux interférences.	12
C/ Bases du choix d'une méthode d'élimination des interférences :	12
1 - Propriétés physico-chimiques des antibiotiques.	13
2 - Propriétés biologiques des antibiotiques.	15
IV - EXPERIENCES PRELIMINAIRES AUX TITRAGES DES ANTIBIOTIQUES ASSOCIES	19
A/ Détermination des seuils de sensibilité et d'interférence des antibiotiques.	21
Interprétation en vue des dosages.	26
B/ Recherche d'un procédé physico-chimique de séparation ou d'inhibition de l'un des antibiotiques :	30
1/ Essais de séparation par solvants sélectifs.	30
2/ Essais des inhibiteurs chimiques :	32
1 - Action du borohydrure de sodium.	32
2 - Action des sels métalliques.	33
Conclusion : méthodes de titrages proposées.	40

V - DOSAGES REALISES DANS L'ASSOCIATION PENICILLINE-DIHYDROSTREPTOMYCINE-AUREOMYCINE 42

1/ Titrages de la pénicilline G sodique par diffusion en gélose - Staphylococcus aureus ATCC 6538 P :

- En présence d'une solution $MgSO_4$ M. 45
- En présence d'une solution $MgSO_4$ 2M. 54

Résultats des deux titrages de la pénicilline G sodique. 60

2/ Titrages de la dihydrostreptomycine :

- Diffusion en gélose - Bacillus subtilis ATCC 6633. 61
- Diffusion en gélose - Staphylococcus "Delarue". 68

Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes de titrage de la dihydrostreptomycine. 74

3/ Titrages de l'auréomycine :

- Turbidimétrie - Staphylococcus IP 52150. 75
- Turbidimétrie - Staphylococcus. aureus ATCC 6538 P 85

Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes de titrage de l'auréomycine. 93

VI - CONCLUSION

VII - ANNEXE : TECHNIQUES DE TITRAGES MICROBIOLOGIQUES - MATERIEL ET APPAREILLAGE 97

VIII - BIBLIOGRAPHIE 111